



**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
İZOLATLARINDA VANKOMİSİNE DÜŞÜK DÜZEYDE DİRENÇ
VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**Dr. Şerife UÇAR
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Yücel DUMAN**

MALATYA-2021



T.C.

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

**METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
İZOLATLARINDA VANKOMİSİNE DÜŞÜK DÜZEYDE DİRENÇ
VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Şerife UÇAR

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Yücel DUMAN

**Bu tez, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından TTU-2020-2304 no'lu proje numarası ile desteklenmiştir.**

MALATYA-2021

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜRLER	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
TABLO, ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Stafilokokların Genel Özellikleri	3
2.2 Stafilokokların Virülans Faktörleri	4
2.2.1 Stafilokokların Yapısal Elemanları	4
2.2.1.1 Kapsül ve Slime Tabaka	4
2.2.1.2 Peptidoglikan Tabaka	4
2.2.1.3 Teikoik Asit	5
2.2.1.4 Sitoplazmik Membran.....	5
2.2.1.5 Protein A	5
2.2.2 Stafilokok Toksinleri	5
2.2.2.1 Alfa Toksin	5
2.2.2.2 Beta Toksin	6
2.2.2.3 Delta Toksin.....	6
2.2.2.4 Gama Toksin ve Panton Valentine Lökositini	6
2.2.2.5 Eksfoliyatif Toksinler	7
2.2.2.6 Enterotoksinler	7
2.2.2.7 Toksik Şok Sendromu Toksini-1	7
2.2.3 Enzimler	8
2.2.3.1 Katalaz	8
2.2.3.2 Kümeleşme Faktörü, Koagülaz.....	8
2.2.3.3 Fibrinolizin, Hiyalüronidaz.....	8
2.2.3.4 Lipazlar	8
2.2.3.5 Fosfolipaz C	8
2.2.3.6 Nükleaz	8
2.2.3.7 Beta Laktamaz	8
2.3 <i>Staphylococcus aureus</i> ilişkili Klinik Tablolar	9

2.3.1 Folikülit	9
2.3.2 Fronkül	9
2.3.3 Karbonkül	9
2.3.4 Süpüratif Hidradenit	9
2.3.5 Mastit	9
2.3.6 Yara Enfeksiyonları	9
2.3.7 Selülit, Erizipel	10
2.3.8 Bakteriyemi	10
2.3.9 Endokardit	10
2.3.10 Menenjit	10
2.3.11 Solunum Yolu Enfeksiyonları	11
2.3.12 Osteoartiküler Enfeksiyonlar	11
2.3.13 Stafilokokal Besin Zehirlenmesi	11
2.3.14 Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu	12
2.3.15 Stafilokokal Toksik Şok Sendromu	12
2.4 Stafilokoklarda Antibiyotik Direnci	13
2.4.1 Penisilin Direnci	13
2.4.2 Metisilin Direnci	15
2.4.3 Vankomisin Direnci	19
2.4.4 Kinolon Direnci	21
2.4.5 Daptomisin Direnci	22
2.4.6 Tigesiklin Direnci	22
2.4.7 Linezolid Direnci	23
2.4.8 Streptogramin Direnci	24
2.4.9 Seftobiprol Direnci	25
2.4.10 Seftarolin Direnci	25
2.5 <i>Staphylococcus aureus</i> İzolatlarını Tanımlama Yöntemleri	26
2.5.1 Gram Boyama	26
2.5.2 Katalaz Testi	26
2.5.3 Koagülaz Testi	27
2.5.3.1 Lam Koagülaz Testi	27
2.5.3.2 Tüp Koagülaz Testi	27
2.5.4 Deoksiribonükleaz Testi	27

2.5.5 Isıya Dirençli Endonükleaz Testi	28
2.5.6 Mannitol Fermantasyonu	28
2.5.7 Kütle Spektrometrisi Temelli Yöntemler	28
3. MATERYAL VE METOD.....	29
3.1 İzolatların Canlandırılması.....	29
3.2 Mikrobiyolojik Kültür ve Tanımlama	29
3.3 İzolatların Metisilin Direncinin Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi İle Belirlenmesi	29
3.4 Broth Mikrodilüsyon Yöntemiyle Vankomisin MİK değerinin Belirlenmesi	30
3.5 Vankomisin Agar Tarama	30
3.6 MRSA İzolatlarında Makro E-Test Yöntemi İle hVISA Varlığı Taranması	31
3.7 MRSA İzolatlarında hVISA, VISA Varlığının Populasyon Profili Analizi-Eğri Altında Kalan Alan (Population Profile Analysis-Area Under The Curve; PAP-AUC) Yöntemi İle Araştırılması.....	31
3.8 MRSA İzolatlarında Moleküler Temelli Testler	32
3.8.1 MRSA İzolatlarından DNA'nın Elde Edilmesi	32
3.8.2 PZR ile <i>mecA</i> Gen Bölgesinin Çoğaltılması	32
3.8.3 PZR ile <i>mecC</i> Gen Bölgesinin Çoğaltılması	33
3.8.4 Elde Edilen PZR Ürünlerinin Jel Elektroforezi ve Görüntülenmesi	34
3.9 Pulsed Field Gel Electrophoresis Yöntemi ile İzolatların Değerlendirilmesi	34
4. BULGULAR.....	37
4.1 <i>S. aureus</i> İzolatlarının Elde Edildiği Örneklerin Dağılımları	37
4.2 PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	39
4.3 Makro E-Test Sonuçları	40
4.4 Broth mikrodilüsyon sonuçları.....	40
4.5 PAP Analizi Sonucu.....	40
4.6 PFGE Analizi Bulguları	42
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR	53
EKLER.....	69
EK.1. ETİK KURUL KARARI	69

TEŞEKKÜRLER

Uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalışmamın bütün aşamalarında bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren başta tez danışmam Doç. Dr. Yücel DUMAN olmak üzere bölüm başkanımız Prof. Dr. İbrahim Halil ÖZEROL, Prof. Dr. Mehmet Sait TEKEREKOĞLU'na, Prof. Dr. Selma AY'a,

Tezimin moleküler çalışmaları aşamasında bilgi ve önerileri ile tezime katkıda bulunan Prof. Dr. Barış OTLU'ya ve Prof. Dr. Yusuf YAKUPOĞULLARI'na,

Bu süreçte bana desteğini esirgemeyen sevgili eşim Ahmet UÇAR'a,

Hayatımın tüm aşamasında bana destek olan sevgili annem, babam ve kardeşlerime,

Asistanlığım süresince ve tez yapım aşamalarında bana destek olan ve katkıda bulunan sevgili asistan arkadaşlarım Dr. Elif Seren TANRİVERDİ, Dr. Halime DAĞGEZ ve Dr. Nur Betül GÜNDÜZ'e sonsuz şükranlarımı sunar ve teşekkür ederim.

Dr. Şerife UÇAR

ÖZET

Amaç: *S. aureus* toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlara yol açan patojenlerin başında gelmektedir. MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde ilk seçilecek antibiyotik vankomisinidir.

Vankomisin tedavisi alan hastalarda tedavide başarısızlıklara neden olan VISA ve hVISA suşları rutin laboratuvar yöntemleriyle tespit edilememektedir. Bu suşların tespitinde altın standart yöntem ise PAP-AUC yöntemidir. Çalışmamızda PAP-AUC yöntemiyle VISA ve hVISA varlığını araştırmayı hedefledik.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamıza 2015-2020 yılları arasında hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen çeşitli örneklerden izole edilip -80°C’de stoklanan 68 MRSA suşu dahil edilmiştir. Öncelikle sefoksitin disk difüzyon yöntemi ile metisilin direnci belirlenen tüm suşlarda PZR yöntemi ile *mecA* ve *mecC* gen varlığı araştırıldı. Bu suşlarda makro E-test, agar tarama, broth mikrodilüsyon ve PAP-AUC yöntemleriyle VISA ve hVISA varlığı araştırıldı. Suşlar arasındaki klonal ilişki PFGE yöntemi ile araştırıldı.

Bulgular: Tüm suşlar *mecA* geni içermesine rağmen hiçbir suşta *mecC* genine rastlanmadı.

Broth mikrodilüsyon yöntemi ile MİK değeri 4 µg/ml bulunan bir suş hariç tüm suşlar duyarlı kategorisinde yer almaktaydı.

Makro E-test yöntemiyle yapılan tarama sonucunda şüpheli hiçbir izolata rastlanmadı. 2 µg/ml vankomisin içeren beyin kalp infüzyon agarla yapılan tarama sonucunda 6 VISA, 4 hVISA şüpheli suş tespit edildi. Altın standart yöntem olan PAP-AUC yöntemi ile bu şüpheli suşlardan bir tanesi, MİK değeri 4 µg/ml olan suş, VISA olarak, 1 tanesi de hVISA olarak değerlendirildi.

PFGE ile baskın bir salgın suşu tespit edilmemiştir.

Tartışma: MRSA enfeksiyonlarında kullanılan vankomisin tedavisi sırasında başarısızlık yaşanan hastalarda VISA ve hVISA olabilme ihtimali göz önünde bulundurulmalı ve tedavide başarısızlık yaşamamak adına vankomisin daha akılcı kullanılmalıdır.

Anahtar Kelimeler: hVISA, *mecA*, *mecC*, MRSA, PAP-AUC, *S. aureus*, VISA

ABSTRACT

Aim: *S. aureus* is one of the leading pathogens causing community and hospital-acquired infections. Vancomycin is the first antibiotic of choice in the treatment of MRSA infections.

VISA and hVISA strains that cause treatment failure in patients receiving vancomycin therapy can't be detected by routine laboratory methods. The gold standard method for the detection of these strains is the PAP-AUC method. In our study, we aim to investigate the presence of VISA and hVISA with the PAP-AUC method.

Materials and Methods: 68 MRSA strains isolated from various samples sent to our hospital's microbiology laboratory between 2015-2020 and stocked at -80 degrees were included in our study. First of all, the presence of *mecA* and *mecC* genes was investigated by PCR method in all strains with methicillin resistance determined by cefoxitin disk diffusion method. The presence of VISA and hVISA was investigated in these strains by macro E-test, agar screening, broth microdilution and PAP-AUC methods. The clonal relationship between strains was investigated by PFGE method.

Results: Although all strains contain the *mecA* gene, no *mecC* gene was found in any strain.

All strains were in the susceptible category, except for one strain of which MIC value was 4 µg/ml by broth microdilution method.

No suspicious isolate was found as a result of the scanning performed with the macro E-test method. As a result of the screening performed with brain heart infusion agar containing 2 µg/ml vancomycin, 6 VISA and 4 hVISA suspect strains were detected. With the PAP-AUC method, which is the gold standard method, one of these suspicious strains, the strain with a MIC value of 4 µg/ml, were evaluated as VISA and one as hVISA.

No dominant outbreak strain detected with PFGE.

Conclusion: The possibility of VISA and hVISA in patients who fail during vancomycin treatment used in MRSA infections should be considered and vancomycin should be used more rationally in order to avoid treatment failure.

Keywords: hVISA, *mecA*, *mecC*, MRSA, PAP-AUC, *S. aureus*, VISA

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: santigrat derece
µl	: mikrolitre
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ATCC	: American Type Culture Collection
bp	: Baz çifti
BKİ	: Beyin-kalp infüzyon agar besiyeri
BKİ-V6	: 6 µg/ml vankomisin eklenmiş beyin-kalp infüzyon agar
BORSA	: Sınırdaki oksasilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
CA-MHB	: Katyon katkılı Mueller Hinton sıvı besiyeri
CDC	: Hastalık Kontrol Merkezi
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
cMLSB	: Yapısal makrolid-linkozamid-streptogramin B direnci
Da	: Dalton
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
ETA	: Eksfoliyatif toksin-A
ETB	: Eksfoliyatif toksin-B
EUCAST	: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	: Gıda ve İlaç Dairesi
gr	: gram
GRD	: Glikopeptid direnç saptama testi
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
HK	: Hastane kaynaklı
hVISA	: Vankomisine heterojen(düşük düzeyde) dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
iMLSB	: İndüklenebilir makrolid-linkozamid-streptogramin B direnci
kDa	: Kilodalton
KKA	: Koyun kanlı agar
LMP	: Düşük erime ısıları agaroz
M	: molar

MALDI-TOF MS	: Matriks aracılı lazer dezorpsiyon iyonizasyon-uçuş süresi kütle spektrometrisi
MET	: Makro E-test
MHA	: Mueller-Hinton agar
MİK	: minimum inhibitör konsantrasyon
ml	: mililitre
MLSB	: Makrolid-linkozamid-streptogramin B direnci
MRSA	: Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	: Makrolid streptogramin direnci
MSSA	: Metisiline duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
NAG	: N-asetil glukozamin
NAM	: N-asetil muramik asit
NCTC	: National Collection of Type Cultures
PAP-AUC	: Popülasyon analiz profili-eğri altından kalan alan
PBP	: Penisilin bağlayan protein
PFGE	: Değişken alanlı jel elektroforezi
PG	: Peptidoglikan
pH	: Power of Hydrogen (Hidrojenin gücü, asitlik bazlık derecesini gösterir)
pmol	: pikomol
PVL	: Panton-Valentin lökositini
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
SCC _{mec}	: Stafilokokkal kaset kromozom mec
SDA	: Sabouraud dekstroza agar
SF	: Serum fizyolojik
SMD	: Sıvı mikrodilüsyon testi
TBE	: Tris-borat-edta x
TE	: Tris-edta
TK	: Toplum kaynaklı
TSST-1	: Toksik şok sendromu toksini-1
UV	: Ultraviyole
Ü	: Ünite
VISA	: Vankomisine azalmış duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
VRE	: Vankomisine dirençli enterokok

VRSA : Vankomisine dirençli *Staphylococcus aureus*

YBÜ : Yoğun bakım ünitesi

α : alfa

β : beta



TABLO, ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ

Tablo 3.1 MecA gen bölgesi için PZR reaksiyon şartları	33
Tablo 3.2 MecC gen bölgesi için PZR reaksiyon şartları	33
Tablo 4.1 MRSA izolatlarının örneklere göre dağılımı	37
Şekil 4.1 Örneklerin kaynağa ve cinsiyete göre dağılımı	38
Şekil 4.2 Örneklerin geldiği bölümlere göre dağılımı	38
Şekil 4.3 İzolatların vankomisin MİK dağılımları	40
Şekil 4.4 1., 44. ve mi 3 izolatlarına ait PAP-AUC grafiği	41
Resim 4.1 MecA pozitif bulunan izolatlardan ilk 18 izolat	39
Resim 4.2 MecC negatif bulunan örneklerden ilk 16'sı	39
Resim 4.3 Toplum kaynaklı izolatlarda PFGE analizi	42
Resim 4.4 Hastane kaynaklı izolatlarda PFGE analizi	43

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Staphylococcus aureus, *Staphylococcaceae* ailesi içinde yer alan Gram-pozitif, katalaz ve koagülaz-pozitif bakteridir (1). *S. aureus*, toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlara yol açan en önemli patojen mikroorganizmalar arasında yer almaktadır. *S. aureus*, sağlıklı bireylerin burunları ve bağırsakları dahil olmak üzere deri, deri bezleri ve mukoza zarları gibi kısımlarında sıklıkla asemptomatik olarak bulunan kommensal bir bakteri olmasına rağmen, dolaşım sistemi, alt solunum yolu enfeksiyonları, deri ve yabancı cisim enfeksiyonları, osteomyelit, endokardit, toksik şok sendromu, stafilokokal gıda kaynaklı hastalıklar ve haşlanmış deri sendromu gibi ciddi, hayatı tehdit eden enfeksiyonlara da neden olabilmektedir (2, 3).

Klinik olarak ciddi hastalıklara yol açan *S. aureus* birden fazla antibiyotik sınıfına karşı direnç geliştirebilmekte ve tedavide önemli sorunlara neden olabilmektedir. 1928 yılında Alexander Fleming tarafından penisilinin keşfedilmesinin ardından, 1940 yılında insanlarda stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde penisilin kullanılmaya başlanmıştır (4). Ancak penisilinin kulanıma girmesinden sadece 2 yıl sonra, 1942’de, ilk penislin dirençli stafilokok suşu belirlenmiş ve stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde tekrar ciddi sıkıntılar yaşanmaya başlamıştır (5). 1950’de penisilinaza dirençli yarı sentetik antibiyotikler (metisilin, nafsilin, oksasilin) bulunmuştur. 1960’da stafilokoklar bu antibiyotiklere de direnç geliştirmiştir. Bunun sonucunda, literatürde metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) tanımı ortaya çıkmıştır. Metisiline dirençli *S. aureus* suşlarına bağlı enfeksiyonlar, metisiline duyarlı suşların neden olduğu enfeksiyonlardan daha yüksek ölüm oranları ile ilişkili olup aynı zamanda hastanede kalış sürelerinin artmasına ve buna bağlı sağlık bakım maliyetlerinde de artışa neden olurlar (6, 7).

MRSA direnci hareketli genetik eleman olan *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCCmec) içinde yer alan *mecA* geninden kaynaklanmaktadır. *MecA* geni PBP2a üretimine neden olur ve çoğu β -laktam antibiyotik bu bölgeye bağlanamaz. Bakteri, Cefaroline ve Cefotiprole gibi anti MRSA antibiyotiklerin dışında kalan tüm β -laktam antibiyotiklere dirençli hale gelir (8, 9).

MecA geni, *S. aureus*’ta metisilin direncinin ana nedeni olarak bilinmesine rağmen 2007’de İngiltere’de büyükbaş hayvanlar üzerine yapılan bir çalışmada *mecA* geni ve PBP2a taşımayan ancak sefoksitine direnç gösteren *S. aureus* suşu izole

edilmiştir. *mecA* ile %69 oranında benzeyen bu gen başlangıçta *mecA*_{LGA251} olarak adlandırılmıştır. Bu gen daha sonra, 2012 yılında Stafilokok Kaset Kromozom Elemanlarının Sınıflandırılmasına İlişkin Uluslararası Çalışma Grubu (IWG-SCC) tarafından *mecC* olarak yeniden adlandırılmıştır (10, 11).

MRSA enfeksiyonlarına karşı tedavide seçilecek en uygun antibiyotik vankomisindir. Ancak, 2002 yılında ilk vankomisine dirençli *Staphylococcus aureus* (VRSA) izolatu bildirilmiş ve buna enterokoklardan *Staphylococcus aureus*'a *vanA* geninin plazmid aracılı aktarımının neden olduğu gösterilmiştir (12). Bununla birlikte *vanA* geni içermeyip vankomisine azalmış duyarlılığa sahip suşlar da gösterilmiş ve bunlar VISA (vankomisine orta duyarlı *Staphylococcus aureus*) olarak tanımlanmıştır (13). Hiramatsu ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada enfeksiyon etkeni olarak *Staphylococcus aureus* izole edilen ve kombine vankomisin tedavisi alan bir hastada tedavi yanıtı olmadığı olduğu, bu suşla ilgili yapılan araştırmanın sonucunda ise bu suşun *vanA* geni içermediği ve elektron mikroskopunda bakıldığında hücre duvar kalınlığının kontrol suşuna göre 2 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca PBP sentezinde de 3 kat artış olduğu belirlenen bu suş hVISA olarak isimlendirilmiştir. hVISA, vankomisin MİK_≤2 olarak duyarlı bulunan *Staphylococcus aureus* kolonilerinin içinde az miktarda (10⁶ suşda 1) vankomisin MİK>2 olan suş bulunması olarak tanımlanmaktadır (14, 15).

VRSA'daki direnç ekzojen olmasına rağmen hVISA ve VISA daki direncin endojen olduğu düşünülmektedir. İn vitro testlerde vankomisin duyarlı olup vankomisin tedavisi alan hastalarda tedavi yanıtının olmaması durumunda hVISA akla getirilmelidir. Özellikle dolaşım sistemi enfeksiyonlarında hVISA olması durumunda mortalitenin artabileceği düşünülmektedir (13). MRSA ile enfekte hastalarda VISA ve hVISA belirlemek, hasta yönetiminde gerek hastanede yatış süresi gerek tedaviye cevap açısından kritik öneme sahiptir. Ancak bunlar rutin laboratuvar yöntemleri ile tespit edilememektedir (16).

Çalışmamıza 2015-2020 yılları arasında hastanemiz tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen çeşitli örneklerden izole edilip -80 °C'de stoklanan 68 MRSA suşu dahil edilmiştir. Bu suşların metisilin direnci Sefoksitin (30 µg disk) ile, *mecA* ve *mecC* geni içerip içermediği ise PZR ile belirlenmiştir. Suşlar arasında epidemiyolojik açıdan ilişki olup olmadığını belirlemek için ise Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) yapılmıştır. Suşların taranması 2µg/ml vankomisin içeren beyin kalp infüzyon agar besiyerinde yapıp şüpheli kolonilere PAP-AUC yöntemi uygulanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Stafilokokların Genel Özellikleri

1880 yılında Alexander Ogston tarafından cerrahi bir yara enfeksiyonundan izole edilen *S. aureus*'un farelere enjekte edilmesi sonucunda apseler olduğu gözlemlenmiştir (17). Bunu takiben Louis Pasteur, insan stafilokok enfeksiyonlarından aldığı irini hayvanlara enjekte etmiş ve hayvanlarda apse oluştuğunu gözlemlemiştir. 1882'de Ogston, bu mikroorganizma için *Staphylococcus* terimini kullanmış ve 1884'te Rosenbach cinsi, *S. aureus* ve *S. albus* olmak üzere iki türe ayırmıştır (18).

Stafilokoklar, Gram (+) boyanma özelliği gösteren, hareketsiz kok morfolojisinde bakterilerdir. Tekli, ikili, dördü ya da kısa zincir şeklinde bulunabilir. Ailenin çoğu üyesi fakültatif anaerob ve katalaz pozitif olmasına karşın *S. aureus subs. anaerobius* ve *S. saccharolyticus* anaerob ve çoğu zaman katalaz negatiftir. Çapları 0.5-1.5 µm arasında değişmekte olup yüksek tuz içeriği olan ortamlarda(%10 NaCl) ve 18-40°C gibi değişik sıcaklık aralığında çoğalabilmektedir (19, 20).

Stafilokoklar koyun kanlı agar (KKA) gibi genel üretim besiyerinde kolayca üreyebilirler. Gram negatif bakterilerce kontamine olmuş besiyerinden izolasyonu için Gram negatif bakterilerin üremesini engelleyen kolistin-nalidiksik agar (CNA) veya feniletıl alkol agar (FEA) besiyeri kullanılır. Burun kültürlerinde *S. aureus* üretimi için % 7.5 sodyum klorür içeren mannitol tuz agar öncelikli tercih edilen besiyeridir. Stafilokoklar bu besiyerlerinde genellikle 24 saat içinde ürerler. Hemen hemen bütün *S. aureus* kolonileri ve bazı koagülaz negatif stafilokok türleri KKA'da hemoliz yapar (19, 20).

Stafilokok kolonileri çoğu zaman düzgün kenarlı, konveks, bazen ıslak yapıda sarı ya da gri renkli koloniler şeklinde görülmektedir. Kistik fibrozis gibi kronik hastalığı olanlarda veya uzun süre antimikrobiyal tedavi alan hastalarda alışılmışın dışında küçük koloni varyantları şeklinde de görülebilmektedir (19, 20).

Stafilokoklar, insanlarda normal flora elemanı olarak bulunabilmektedirler. Stafilokokların deri ve nazofarenkste asemptomatik olarak taşıyıcılığı, sağlık bakım ilişkili enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Nazofarenks taşıyıcılığının sağlıklı yetişkinlerdeki oranı %15'tir ve bu oranın sağlık personelinde, İV ilaç kullananlarda,

hastanede uzun süre tedavi alan hastalarda daha da fazla olduğu düşünülmektedir. Kuru yüzeylerde uzun süre canlı kalmasına rağmen ısı, dezenfektan ve antiseptik solüsyonlarına karşı duyarlıdır. Enfeksiyon etkeni olarak en sık karşımıza çıkanlar koagülaz negatif stafilokoklar içinde *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* ve koagülaz pozitif stafilokoklar içinde ise *S. aureus*'tur (19, 20).

Staphylococcus aureus sağlıklı insanlarda deri kıvrım bölgeleri, aksilla, vajina, perine, anterior burun deliklerinde, yenidoğanlarda göbek kordonu, perianal bölge ve deride asemptomatik olarak bulunabilmektedir. Lökosit kemotaksi bozuklukları, cilt yaralanmaları, malignansi, antimikrobiyal ilaç kullanımı, konjenital veya kazanılmış hipogamaglobulinemiler, lösemiler gibi zemin hazırlayıcı durumlarda fırsatçı enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu tür durumlarda *S. aureus* hafif yumuşak deri enfeksiyonlarından mortalite ve morbiditesi yüksek ciddi enfeksiyonlara yol açabilmektedir (19,20).

2.2 Stafilokokların Virülans Faktörleri

2.2.1 Stafilokokların Yapısal Elemanları

2.2.1.1 Kapsül ve Slime Tabaka

Çoğu stafilokok türünde hücre duvarını dışarıdan saran polisakkarid yapıya kapsül denilmektedir. Kapsül, bakteriyi polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) fagositozuna karşı korumaktadır. Bazı stafilokoklarca yapılan protein, peptid, monosakkarit içeren ve suda çözünebilen gevşek yapılı maddeye slime adı verilir. Slime, bakterinin katater, şant ve eklemler gibi yüzeylere tutunmasına yardımcı olmaktadır (19, 20).

2.2.1.2 Peptidoglikan Tabaka

Bakterilerde sağlamlık ve direnci sağlayan hücre duvarının önemli bir komponenti olan peptidoglikan tabaka, ardışık yer alan ve çapraz bağlarla birbirine bağlanan N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asitten oluşmaktadır. Gram pozitif bakterilerde çok katlı olarak karşımıza çıkmaktadır. Peptidoglikan sentezinde penisilin bağlayan proteinler (PBP) yer almakta ve bu proteinler beta-laktam antimikrobiyallerin ana bağlanma bölgesini oluşturmaktadır. *mecA* geninin kazanılmasıyla alışlagelmiş PBP'den farklı bir protein olan PBP2a sentezi sonucunda β -laktam antimikrobiyallerin bu bölgeye bağlanmaları azalır (19, 20).

Peptidoglikan, gram negatif bakterilerdeki endotoksine benzer şekilde etki ederek endojen pirojen yapımı, IL-1 salınımının uyarılması, kompleman aktivasyonu ve PMNL kümeleşmesine yol açar (19, 20).

2.2.1.3 Teikoik Asit

Stoplazmik membrandaki glikolipitlere veya N-asetilmuramik asite bağlı olup peptidoglikan tabakaya gömülü hücre duvarı elemanıdır (19, 20).

2.2.1.4 Sitoplazmik Membran

Protein, lipid, karbonhidratlardan oluşan, sitoplazmayı sararak hücrenin osmotik basıncını sağlayan ve biyosentezden sorumlu olan yapısal elemandır (19, 20).

2.2.1.5 Protein A

Staphylococcus aureus'taki peptidoglikan tabakaya bağlı bulunan, 42.000 Da molekül ağırlığındaki bu yapı çoğu koagülaz negatif stafilokoklarda bulunmaz. Protein A, Ig G3 dışındaki Ig G'lerin Fc kısımlarına afinite gösterir. Opsonizasyonu engelleyerek bakteriyi, nötrofil fagositozu ve kompleman aktivasyonuna karşı korumuş olur (19, 20). B hücre reseptörlerine bağlanarak özgül antikor yanıtı oluşumunu baskılayabilmesi nedeniyle "B hücre süperantijeni" olarak da adlandırılmaktadır (21). *S. aureus* kaynaklı enfeksiyon hastalıklarının tanısında kullanılan koaglütinasyon testlerinin temelini oluşturmaktadır (19, 20).

2.2.2 Stafilokok Toksinleri

Alfa, beta, delta, gama ve Panton-Valentine lökositini, A ve B eksfoliyatif toksin, A'dan R'ye on sekiz adet enterotoksin ve toksik şok sendromu toksini *Staphylococcus aureus*'un sahip olduğu toksinlerdir (19,20).

2.2.2.1 Alfa Toksin

Plazmid veya bakteri kromozomunca kodlanabilen, çoğu *S. aureus* suşu tarafından üretilen 33.000 Da ağırlığında bir proteindir. Eritrositler daha az olmakla birlikte monosit, makrofaj ve lenfositler bu toksinin etkisine oldukça duyarlıdır (19, 22). Trombositlerin de bu toksine duyarlı olmaları *S. aureus* bakteriyemisi esnasında septik trombotik olayların ortaya çıkmasına neden olur (18). Toksin, hücre membranına etki ederek 1-2 nm çapında por oluşturur. Dışarı K^+ atılımı, içeri Na^+ , Ca^{2+} alımının etkisiyle hücre osmotik olarak şişer ve lizise uğrar (19). Alfa toksin ayrıca KKA'da üreyen *S. aureus* kolonilerinin etrafındaki eritrositlerin hemolizine neden olur(20).

2.2.2.2 Beta Toksin

Farklı hücre çeşitlerine etki eden bir sfingomiyelinazdır. Sfingomiyelinaz C olarak da adlandırılmaktadır. Etki göstermesi için ortamda magnezyum iyonlarına ihtiyaç duyan bu protein ısıya duyarlı olup 35.000 Da moleküler ağırlığındadır (23). Sfingomiyelin üzerinden etki gösterdiklerinden hücre zarlarının sfingomyelin bulundurma miktarlarına göre etkinlikleri değişkenlik gösterir. Bu da Beta toksinin farklı canlılarda farklı etki göstereceği anlamına gelmektedir (24).

2.2.2.3 Delta Toksin

Koagülaz negatif stafilokokların %50-70' inde, *S. aureus* izolatlarının %97'sinden fazlasında üretilen 3.000 Da molekül ağırlığında bir peptiddir. Sürfaktan veya deterjan benzeri etki göstererek hücre membranını tahrip eder böylece zarın stabilitesi bozulup porlar oluşur ve sonuç olarak hücre içeriği dışarı sızar (25).

2.2.2.4 Gama Toksin ve Panton Valentine Lökositini

Gama toksin *S. aureus* izolatlarının neredeyse tamamı tarafından üretilir. Panton Valentine lökositini (PVL) bikomponent por oluşturur. Elektroforezdeki göç hızlarına bağlı olarak S(slow) ve F(fast) olmak üzere 2 polipeptidden oluşmuştur. Üç ayrı S proteini [H1gA(hemolizin gama A), H1gC, LukS-PV] ve iki ayrı F proteini (H1gB, LukF-PVL) gösterilmiştir. PVL, *S. aureus* izolatları arasında lizojenik bakteriyofajlarca transfer edilir. PVL'nin insan enfeksiyonlarındaki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte insan ve tavşan nötrofilleri ile sıçan alveolar makrofajlarında litik etki gösterdiği bilinmektedir. Gama toksin ve PVL etkisiyle membranda porlar oluşur ve hücre geçirgenliği bozulur, böylece hücre osmotik olarak şişer ve parçalanır (19, 20, 26).

Panton Valentine lökositini hem MRSA hem de MSSA suşlarında bulunabilmektedir (27). Hastane kaynaklı MRSA enfeksiyonlarında %5'ten daha az bulunurken, toplum kaynaklı MRSA enfeksiyonlarının hemen hepsinde bulunmaktadır. Çok merkezli yürütülen çeşitli çalışmalarda toplum kaynaklı MRSA(TK-MRSA) enfeksiyonlarında PVL ile deri, yumuşak doku enfeksiyonları ve hastane kaynaklı pnömoni arasındaki ilişki araştırılmış ancak klinik kötü gidişle PVL arasında herhangi bir ilişki gösterilememiştir (28). PVL salgılayan TK-MRSA izolatlarının çoğunlukla SCC *mec* tip IV geni içerdiği gösterilmiştir (19, 20).

2.2.2.5 Eksfoliyatif Toksinler

Stafilokoksik haşlanmış deri sendromuna (SSSS) neden olan bu toksin 24.000 Da molekül ağırlığında olup *S. aureus* izolatlarının %1-2'sinde bulunmaktadır. Bakteriyofajlarca taşınan ısıya dirençli ET-A (eta) ve plazmidlerce taşınan ısıya duyarlı ET-B (etb) geni olmak üzere 2 ayrı formu vardır (29). Serin proteazlar içinde yer alan ET-A ve ET-B, epidermisin stratum granulosum tabakası içinde yer alan desmoglein 1'i parçalayıp, epitel hücreleri arasında bulunan hücresel bağları kopartarak etkilerini gösterirler. Bu toksinler aynı zamanda süperantijen ailesi içerisinde yer almaktadırlar (30). Sitolitik etkisi olmayan bu toksinler, inflamasyon oluşturmadıkları için tutulan bölgede lökosit ve stafilokok görülmez. SSSS çoğunlukla küçük çocuklarda görülmekle birlikte nadiren yetişkinlerde ve büyük çocuklarda da görülebilmektedir (19).

2.2.2.6 Enterotoksinler

A'dan R'ye tanımlanmış on sekiz ayrı stafilokok enterotoksini bulunmaktadır. Enterotoksin C ve D kontamine süt ürünlerinde bulunmaktadır. Enterotoksin B ise psödomembranöz enterokolitin nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca enterotoksin B ve C menstruasyon ilişkisiz toksik şok sendromuna neden olmaktadır. Besin zehirlenmelerinde en sık karşımıza çıkan toksin ise enterotoksin A'dır. Enterotoksin A, 100 °C de 30 dakika ısıtılmayla inaktive olmayıp ayrıca GİS'den salınan enzimlere de dirençlidir. Eğer bir besin maddesinde toksin oluşturmuş stafilokoklar üremişse, artık bu besinlerin orta düzey ısıtılması veya yendikten sonra salgılanan enzimlerin etkisi besin zehirlenmesini engelleyememektedir ve 2-8 saat içinde kusma veya kusmaya eşlik eden ishal ortaya çıkmaktadır. Süperantijen özelliği gösteren bu toksinler T hücrelerini direkt uyararak yoğun sitokin cevabı oluşturlar (19, 20).

2.2.2.7 Toksik Şok Sendromu Toksini-1

Süperantijen özelliği gösteren, ısıya dirençli, kromozomca kodlanan 22.000 Da molekül ağırlığında bir toksindir. Toksin oluşumu için yüksek miktarda oksijen ve nötral pH gerekli olduğundan yara enfeksiyonlarında nadiren toksik şok sendromu tablosu oluşur. Süperantijen özelliği göstermesinin sonucu olarak T hücre uyarımı ve sitokin cevabı oluşturduğu için endotel hücrelerinde sızıntıya, yüksek dozlarda ise hücresel sitotoksositeye yol açmaktadır. Toksik şok sendromu gelişen hastalarda hipovolemik şokun yol açtığı çoklu organ yetmezliği tablosu ölüm nedenidir (19, 20).

2.2.3 Enzimler

S. aureus, virölansında önemli yer tutan çeşitli enzimler sentezlemektedir.

2.2.3.1 Katalaz

Fagosite edilen hücrelerde oluşan oldukça toksik etkili hidrojen peroksit ve serbest oksijen radikallerine karşı bakteriyi koruyan enzimdir. Üretilen katalaz, toksik hidrojen peroksiti su ve oksijene dönüştürmektedir (19, 20).

2.2.3.2 Kümeleşme Faktörü, Koagülaz

Bağlı koagülaz, bilinen diğer adıyla kümeleşme faktörü, fibrinojeni direkt olarak fibrine çevirir ve bakterilerde kümeleşmeye neden olur. Serbest koagülaz ise protrombine etki ederek fibrinojeni fibrine dönüştürür ve sonuç olarak pıhtılaşma olayı gerçekleşir (19, 20).

2.2.3.3 Fibrinolizin, Hiyalüronidaz

Fibrinolizin plazminojen aktivatörü olup oluşan pıhtıyı eriterek, hiyalüronidaz da bağ dokusunu hidrolize ederek enfeksiyonun komşu dokulara yayılımını hızlandırır (31).

2.2.3.4 Lipazlar

Lipidleri hidrolize ederlek kıl foliküllerinin olduğu bölgelerde enfeksiyona neden olurlar. Fronkül gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (19, 20)

2.2.3.5 Fosfolipaz C

Yaygın damar içi pıhtılaşma ve akut solunum yetmezliği gelişimi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (19, 20).

2.2.3.6 Nükleaz

Hem endo hem de ekzonükleaz aktiviteye sahip olan bu enzimi sentezleyen stafilokoklar, DNA'yı parçalayarak etki gösterirler (19,20).

2.2.3.7 Beta Laktamaz

İndüklenebilir veya yapısal halde bulunabilen bu enzim, bakteriyi penisilin ve ampisiline dirençli hale getirebilir. Üzerinde eritromisin ve tetrasiklin gibi antibiyotiklere direnç genini barındıran plazmidler, aynı zamanda β -laktamaz genini de bulundurmaktadırlar. Bu enzim, β -laktam antibiyotiklerdeki β -laktam halkasını hidrolize ederek antibiyotiği etkisiz hale getirirler. Plazmid aracılı kodlanan bu gen, konjugasyon veya transformasyonla diğer bakterilere aktarılabildiğinden günümüzde

dünya genelinde *S. aureus* suşlarının yaklaşık %90-%95'i penisiline dirençli hale gelmiştir (32).

2.3 *Staphylococcus aureus* İlişkili Klinik Tablolar

S. aureus, toksin aracılı (SSSS,TSS, bein zehirlenmesi) ya da doğrudan yıkımla (endokardit, osteomyelit, deri enfeksiyonları vb.) hastalıklara neden olmaktadır. Yabancı cisim veya altta yatan fagositik, kemotaktik bozukluk varlığında kişi *S. aureus* enfeksiyonlarına karşı duyarlı hale gelmektedir (19, 20).

2.3.1 Folikülit

Kıl köklerinin püylü enfeksiyonudur. Sistemik enfeksiyon bulguları olmayıp yara yerinde sınırlı ağrı, şişlik ve kızarıklıkla karakterizedir (20).

2.3.2 Fronkül

Kıl foliküllerinin derin yerleşimli püylü enfeksiyonudur. Sistemik enfeksiyon bulguları bulunmamakla birlikte ağrılı, nekrotik zemin üzerinde sert ve kabarık lezyonların bulunmasıyla karakterizedir (20).

2.3.3 Karbonkül

Subkutan dokuları da içeren, kıl foliküllerinin derin yerleşimli enfeksiyonudur. Fronkül ve folikülitin aksine ateş, titreme gibi sistemik enfeksiyon bulguları eşlik etmektedir. Genellikle sinüs kanalları vardır. Hastalara cerrahi drenaj ve antimikrobiyal tedavi uygulanır (20).

2.3.4 Süpüratif Hidradenit

Apokrin ter bezlerinin bulunduğu koltuk altı, kasık, perine gibi bölgelerde ağrı, şişlik ve kızarıklıkla karakterize derinin kronik inflamatuvar hastalığıdır. Genellikle sistemik enfeksiyon bulguları bu tabloya eşlik etmez (20).

2.3.5 Mastit

Genellikle yeni doğum yapmış ya da emziren annelerde görülen meme dokusunun enfeksiyonudur. Ağrı, şişlik, kızarıklık gibi bulguların eşlik ettiği bu tablo drenaj ve antimikrobiyal tedavi gerektirir (20).

2.3.6 Yara Enfeksiyonları

İmmün bozukluğu olmayan kişilerde, genellikle cerrahi işlem sonrası veya yabancı cisim varlığında yara yeri enfeksiyonuna neden olur. Yara bölgesinde şişlik, kızarıklık, ağrı gibi bulgular vardır (19, 20). Tedavisi genellikle pürülan sıvının dışarı

boşaltılması, yabancı cisim varsa çıkarılması ve antimikrobiyal tedavi verilmesi temeline dayanmaktadır. Çoğu zaman nazal *S. aureus* taşıyıcısı olan bireylerde burundaki *S. aureus* suşu yara yeri enfeksiyonlarına yol açmaktadır (33).

2.3.7 Selülit, Erizipel

Sıklıkla A grubu β -hemolitik streptokokların, nadiren *S. aureus*'un neden olduğu, deri altı yağ dokusunu da kapsayan cilt enfeksiyonudur. Tululan bölgenin sınırları keskin ve ciltten kabarıkça buna da erizipel denilmektedir. Çoklu mikrobiyal etkenler de enfeksiyona eklenebileceğinden geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi başlanmalıdır (19, 20).

2.3.8 Bakteriyemi

S. aureus, hastane ve toplum kaynaklı bakteriyeminin en sık etkenlerinden biridir. Toplum kaynaklı bakteriyemi, sağlık hizmetleri ile ilişkili ise genellikle hastada kalıcı bir katater varlığı, eğer sağlık hizmetleri ile ilişkili değilse de hastalarda genellikle yara, apse, yumuşak doku enfeksiyonu gibi lokalize bir enfeksiyon odağı varlığı bakteriyemi gelişimine neden olmaktadır. Hastane enfeksiyonları ise hastaneye yatıştan 2 veya daha fazla gün sonrasında ortaya çıkmakta ve izole edilen suş toplum kaynaklı enfeksiyonlara göre daha dirençli olmaktadır (20). En çok karşılaşılan semptom ateş, üşüme ve titirmedir (20). Hastaların yaklaşık %10'unda endokardit gelişimi gözlenir (34). Bakteriyeminin zemininde enfekte yabancı cisim varlığı yatıyorsa tedavide öncelikle yabancı cisim çıkarılmalı, işlem sırasında ve sonrasında antimikrobiyal tedavi uygulanmalıdır (35).

2.3.9 Endokardit

Doğal ve prostetik kapak endokarditinde en sık karşılaşılan etkenlerden biri *S. aureus*'tur. Ateş, artralji, myalji gibi grip benzeri semptomlar olabileceği gibi yeni oluşmuş kardiyak üfürüm de gözlenebilmektedir. Kapaklarda vejetasyon oluşabilir ve bu vejetasyonlar bulunduğu yerden koparak çeşitli organlarda emboliye neden olmaktadır (20). *S. aureus* kaynaklı endokarditlerde mortalite %50'lere kadar çıkabilmektedir (19).

2.3.10 Menenjit

S. aureus kaynaklı menenjit genellikle kafa travmasına sekonder veya cerrahi müdahale sonrasında karşımıza çıkmaktadır (36). Menenjit etkeni olarak nadir görülmekle birlikte etken olduğu zaman mortalitesi yüksektir (20).

2.3.11 Solunum Yolu Enfeksiyonları

Toplum kaynaklı, ventilatör ilişkili ve sağlık bakımı ile ilişkili pnömonilerin en sık etkeni olarak *S. aureus* karşımıza çıkmaktadır (37). Genellikle oral sekresyonların aspirasyonu veya hematogen yayılımla solunum sistemi enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Hastane kaynaklı pnömonilerin çoğunluğu MRSA kaynaklıdır ve genellikle komorbid hastalığı bulunan yaşlı kişilerde çıkma eğilimindedir (38).

Solunum yolunda *S. aureus*'un varlığı, hastanın immün cevabına bağlı olarak asemptomatik kolonizasyondan fulminan invazif hastalığa kadar geniş bir yelpazede sonuçlara yol açabilir. Akciğer parankiminde masif polimorfonükleer lökosit varlığı ve küçük apse odaklarının oluşumu, *S. aureus* pnömonisinin tipik bulgularıdır ve PVL pozitifliği ile ilişkilendirilmiştir (39, 40).

2.3.12 Osteoartiküler Enfeksiyonlar

S. aureus, doğal eklem septik artriti, protez eklem enfeksiyonu ve osteomyelitin en sık etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır (41). *S. aureus* osteomyeliti hematogen yolla veya doğrudan lokal enfeksiyonun travma veya cerrahi girişim sonucu yayılmasıyla oluşmaktadır. Çocuklarda daha çok uzun kemik uçları, erişkinlerde ise aksiyel iskelet tutulumu olmaktadır (42). Kemiğin malign hastalıklarını taklit eden radyografik görüntülemelerle birlikte ateş, kilo kaybı, kemik ağrısı gibi spesifik olmayan bulgular görülebilmektedir (43). *S. aureus*'a bağlı septik artrit genellikle bakteriyeminin bir komplikasyonu olup eklem bölgesinde ağrı, ısı artışı ve kızarıklık olur. Tanısı eklemden alınan pürülan sıvının gram boyaması ve kültürü ile konulur. Tedavide genellikle vankomisin kullanılır (20).

2.3.13 Stafilokokal Besin Zehirlenmesi

En sık görülen gıda kaynaklı intoksikasyon tablosu olup, bakterinin direkt etkisi ile değil, oluşturduğu ısıya dayanıklı toksinin etkisiyle meydana gelir. En sık bu tabloya yol açan besinler jambon gibi işlenmiş etler, kremalı pasta, dondurma, konserve gıdalar ve patates salatasıdır. *S. aureus* yüksek tuz miktarı bulunan ortamlarda da iyi üreyebildiğinden gıdanın tuzlanması bu toksikasyon tablosunun oluşmasını engelleyemez. Gıdalara *S. aureus* bulaşı genellikle bir gıda yapımcısı aracılığıyla olur. Bu *S. aureus* enfeksiyonu bulunan bir el aracılığıyla olabileceği gibi asemptomatik nazofarenks taşıyıcılığı ile de olabilmektedir. Gıdanın ısıtılması bakteriyi öldürse de toksini etkisizleştirememektedir. Toksin üretilmiş gıda alımını takiben genellikle 2-4 saat içinde kişide kansız ve sulu ishal, bulantı, kusma, şiddetli karın ağrısının görüldüğü

ateşin genellikle eşlik etmediği bir tablo oluşur ve semptomlar genelde 24 saat içinde kendiliğinden kaybolur. Tablo, bakterinin direkt etkisiyle olmayıp toksin aracılı olduğu için antibiyotik tedavisi gerekli değildir. Semptomatik tedavinin uygulanması yeterlidir (19, 20).

2.3.14 Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu

Bazı *S. aureus* suşları tarafından üretilen ve intraepidermal hasara yol açan iki eksfoliyatif toksin (ET) eksfoliatin A (ET-A) ve eksfoliatin B (ET-B)'den birinin neden olduğu, haşlanmış deri görünümüne yol açan ve sistemik bulguların eşlik ettiği tablodur. SSSS, Ritter von Ritterschein hastalığı, Ritter hastalığı, Lyell hastalığı ve epidermisin stafilokokal nekrolizi olarak da adlandırılır. 5 yaşından küçük çocuklar ve bebekler ağırlıklı olarak etkilenir. SSSS tipik olarak nazofarenks, konjunktiva, deri, iç kulak, umbilikus veya idrar yolunda hafif bir enfeksiyon odağı ile ilişkilidir (44). Genel olarak, SSSS'nin başlangıç semptomu, cildin tüm yüzeyinde kızarıklık ve ateştir. 24-48 saat içinde tüm vücutta içi sıvı dolu kabarcıklar oluşur. Kabarcıklar yırtılır ve ortaya çıkan alan yanık olarak görünür. SSSS'de cilt hafif bir dokunuşla dahi hemen soyulur ve yanmış cilt olarak görünen ıslak kırmızı alanlar bırakır ve buna da nikolsky işareti adı verilir (45, 46). Kreşlerde ve yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde SSSS salgınları görüldüğüne dair çalışmalar mevcuttur. Mortalitesi % 5'in altındadır ancak immün yetmezliği veya böbrek hastalığı olan kişilerde ölüm oranı % 60'lara çıkmaktadır. Ölümler genellikle hasarlı deride oluşan sekonder bakteri enfeksiyonlarına bağlı olarak gelişmektedir (19, 20).

2.3.15 Stafilokokal Toksik Şok Sendromu

Toksik şok sendromu (TSS) erişkinlerde ve çocuklarda toksin üreten *S. aureus* ve *Streptococcus pyogenes* suşları aracılığıyla oluşan, yüksek ateş, hipotansiyon, döküntü, çoklu organ yetmezliği ile karakterize akut ve şiddetli hastalık tablosudur. Nadir fakat şiddetli bir hastalık olan *S. aureus*'a bağlı TSS'de ölüm oranı 0 ile %22 arasında değişmektedir (47). *S. aureus*, menstrual dönemde hiperabsorban tampon kullanan kadınlarda çoğalmakta ve vajinadaki CO₂'den zengin nötral pH'lı ortam toksin (TSST-1) üretimine neden olmaktadır. Üretilen toksin süperantijen özelliğindedir ve T lenfositlere sunulmayı gerektirmez. Osteomyelit, cerrahi yara enfeksiyonu, apse, yanık, nazal tamponlar veya influenza pnömonisi sonrasında kadın veya erkeklerde vajinal tampon ilişkisiz TSS gösterilmiştir (48). Menstruasyon ile ilişkisiz vakalar menstruasyon ilişkili olanlara göre daha yüksek mortaliteye sahiptir (49). Septik şok,

Kawasaki hastalığı, ilaç reaksiyonu, eozinofili veya DRESS sendromu ile karışabilir (50). TSS oluşan hastalarda hastalık sırasında veya sonrasında TSST-1'e karşı özgün antikor gelişimi gözlenmez, bu nedenle hastalar TSS'na karşı duyarlı halde kalır (51). Toksin kaynaklı sistemik bir hastalık olduğu için genellikle kan kültürlerinde pozitiflik görülmez. TSS'nda tedavi destek tedavisi, antibiyoterapi, intravenöz immünglobulin (IVIG), bazı hastalarda da cerrahi işlem şeklinde düzenlenmektedir. Antibiyoterapide genellikle antitoksin etkileri bulunan klindamisin, florokinolonlar, rifampin gibi ilaçlar tercih edilmektedir (20).

2.4 Stafilokoklarda Antibiyotik Direnci

Antibiyotikler, bakterilerin olağan aktivitelerini engelleyen, doğal ya da kimyasal olarak elde edilen maddelerdir. 70'li yıllarda bakteriyel enfeksiyonların tamamının iyileştirilebilir olduğu düşünülürken, zamanla *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi enfeksiyonların tedavisinde yaşanan çoklu antibiyotik direnci gibi güçlükler bu anlayıştan hekimleri uzaklaştırmıştır. Günümüzde bakterilerde gelişen bu direncin nedeninin uygunsuz antibiyotik kullanımına ve verimi artırmak amacıyla hayvan yemlerine ilave edilen antibiyotiklere bağlı olduğu düşünülmektedir. Stafilokokların da dahil olduğu gram pozitif bakterilerde gelişen direnç, tıp dünyasında ilgi odağı olmuştur (52). Geliştirdiği enfeksiyonlarda uygun antibiyoterapiyle dahi mortalite oranı %20-40 arasında değişen *S.aureus*, nozokomiyal enfeksiyon etkenleri arasında ilk sıralarda karşımıza çıkmakla beraber toplum kaynaklı enfeksiyonlarda da sık görülmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar yoğun bakım ünitelerinden izole edilen MRSA oranının %80 gibi yüksek oranda olduğunu göstermektedir (53). Günümüzde şaşırtıcı bir şekilde MRSA'lar sadece hastanelerden değil toplumdan da izole edilmektedir. Vankomisin MİK değerleri $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ olan suşların tedavisi sırasında görülen başarısızlık da stafilokoklarda ciddi bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır (54). Bakteriler tarafından geliştirilen her dirençle birlikte yeni antibiyotiğe duyulan ihtiyaç artmış ve her yeni geliştirilen antibiyotiğe de çok geçmeden direnç gelişmiştir. Bunun en çarpıcı örneğini *S. aureus*'ta görmekteyiz (54).

2.4.1 Penisilin Direnci

Antibiyotiklerin keşfinden önceki yıllarda *S. aureus* bakteriyemisine bağlı ölümler yaklaşık %80 civarında görülmekteydi (55). 1940'larda penisilinin keşfiyle birlikte *S. aureus* enfeksiyonlarına bağlı ölümlerde dramatik bir düşüş yaşandı. Ancak

bu durum çok uzun sürmedi ve penisilinin keşfinden sadece 2 yıl sonra 1942’de, önce hastanelerde sonra tüm toplumda penisiline dirençli *S. aureus* izolatları gösterildi (56). 1960’ların sonlarına gelindiğinde ise hastane ve toplum kaynaklı *S. aureus* izolatlarının %80’den fazlasının penisiline direnç geliştirdiği görüldü (57).

Bakterilerin yaşamlarını sürdürebilmeleri hücre duvarının varlığına bağlıdır. Büyüme ve bölünme sırasında *S. aureus*, N-asetilmuramik asit (NAM) ve N-asetilglukozamin (NAG) birimlerinden oluşan kalın bir peptidoglikan tabakayı sentezlemektedir. Peptid yapı organizmaya göre değişmekle birlikte *S. aureus*’ta bu pentapeptid L -Ala-γ- D -Glu- L -Lys(Gly)₅ - D -Ala- D -Ala’dır; pentaglisil kısmı lizin yan zincirine bağlıdır. Peptidoglikan yapının sentezi, çapraz bağlanmaları sağlayan Penisilin Bağlayıcı Protein (PBP) olarak adlandırılan transpeptidazlar ve transglikosilazların katalitik işlevleri aracılığıyla gerçekleşir. PBP’lerin aktiviteleri bakterilerin canlılığını sürdürebilmesi için gerekli olduğundan β-laktam antibiyotiklerin istenilen hedef bölgeleri de PBP’lerdir. Penisilin bakterisidal bir antibiyotik olup diğer β-laktam antibiyotikler gibi D-alanil-D-alanin analogudur ve transpeptidazın aktif bölgesine bağlanıp bakterilerdeki peptidoglikan tabaka sentezini engelleyerek etki göstermektedir. Peptidoglikan tabakadaki çapraz bağlar oluşturulamadığı için hücre duvarı kırılgan hale gelir ve osmotik basınç nedeniyle de hücre lizise gider (52, 58).

Kirby ilk olarak penisilinin, penisiline dirençli *S. aureus* suşu tarafından inaktive edildiğini göstermiştir (59). Günümüzde *S. aureus* izolatlarının %90’dan fazlası penisilinaz üretmektedir (60,61).

Stafilokoklardaki penisilin direncine β -laktamaz genini kodlayan ve bir plamid üzerinde taşınan *blaZ* aracılık etmektedir (62). Stafilokoklar, β -laktam antibiyotiğe maruz kaldığında sentezlenip, β-laktam halkayı parçalayan bu enzim çoğunlukla ekstrasellülerdir ve antirepressör *blaR1* ve repressör *blaI* tarafından düzenlenir. Son çalışmalar, β-laktamaz sentezinden sorumlu olan sinyal yolunun, düzenleyici proteinler *blaR1* ve *blaI*’nin ardışık bölünmesini gerektirdiğini göstermiştir. β-laktamlara maruz kaldıktan sonra, bir transmembran sensör-dönüştürücü olan *blaR1* kendi kendini keser (61,62). Zhang ve ark. bölünmüş proteinin, bastırıcı *blaI*’i doğrudan veya dolaylı olarak (ek bir protein, *blaR2*, bu yola dahil olabilir) bölen bir proteaz olarak işlev gördüğünü ve *blaZ*’nin enzimi sentezlemesine izin verdiğini varsayar. Böylelikle β-laktamaz sentezi gerçekleşerek β-laktam antibiyotiklere direnç gelişimi ortaya çıkmış olur (61).

2.4.2 Metisilin Direnci

Penisiline dirençli *S. aureus*'un neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılmak üzere 1950'lerde β -laktamazlara dirençli yarı sentetik bir antibiyotik olan metisilin keşfedildi. Metisilin ve diğer β -laktamazlara dirençli penisilinlerin kullanılmasıyla birlikte tedavide büyük bir başarı sağlandı ancak bakterinin metisiline direnç geliştirmesi çok uzun sürmedi ve 1960'da metisiline dirençli suşlar göstrildi (62, 63).

MRSA keşfedildikten sonra, 1980'lere kadar hala nadir enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkmaktaydı. Ancak 1980'lerden sonra hastane kaynaklı enfeksiyon etkenleri arasında sık görülmeye başlandı. Başlangıçta sadece hastane enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkan MRSA, kısa süre sonra topluma da yayıldı ve toplum kaynaklı enfeksiyon etkenleri arasında da görülmeye başlandı (64).

Metisilin direnci, β -laktamazlar aracılığıyla hidrolize olmayan β -laktam antibiyotiklere (metisilin, oksasilin, nafsilin, kloksasilin, dikloksasilin) karşı direnç olarak tanımlanmaktadır (65). Metisiline direnç, penisiline karşı geliştirilen dirençten farklı olarak plazmidlerce olmayıp, kromozom kaynaklıdır. Hareketli genetik eleman olan, metisiline duyarlı *S. aureus*'ta bulunmayan, stafilokokal kaset kromozomu (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*; *SCCmec*) olarak adlandırılan kaset bölgesinde yer alan *mecA* geni aracılığıyla metisilin direnci gelişmektedir. *SCCmec* geni içeren *S. aureus* suşları MRSA olarak adlandırılırken, *SCCmec* geni içermeyen suşlar metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) olarak isimlendirilirler (20). *MecA* geni farklı bir penisilin bağlayan protein olan PBP2a'yı sentezler ve bu da β -laktam yapısındaki antibiyotiklere düşük afinite göstererek bakteriyi sentetik penisilinlere (metisilin, nafsilin, oksasilin) ve çoğu sefalosporinlere (antistafilokokal penisilinler hariç) dirençli hale getirir (66). Metisilin direnci için gerekli olan başka genler de tanımlanmıştır, bunlar *fem* (factors essential for expression of methicillin resistance) ve *aux* (auxiliary) genleridir (66).

PBP2a'nın sentezi *mecRI* ve *mecI* aracılığıyla kontrol edilmektedir. *mecRI* ve *mecI*, β -laktamazı kodlayan genin (*bla*), antirepressor (*blaRI*) ve repressor (*blaI*) düzenleyicilerinin eşdeğeri olarak düşünülebilir. Normal düzenleyici genler olan *mecA* ve *mecRI/mecI* bulunan suşlarda β -laktamaz sentezinde görülen durumun tersine daha yavaş bir PBP2a sentezi gerçekleşmektedir (66).

2001’de Wu ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada *S. aureus*’ta belirlenen *mecA* geninin antibiyotiklere duyarlı *Staphylococcus sciuri* ‘de gösterilen *mecA* geninin homoloğu olduğunu göstermiştir (67). *MecA* geni *S. aureus*’a özgü olmayıp diğer stafilocok türlerinde de (*S. pseudintermedius*, *S. intermedius*, *S. vitulinus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* ve *S. saprophyticus*) gösterilmiştir (10).

Mayıs 2007’de, İngiltere’de büyükbaş hayvanlarda gelişen mastit üzerine yapılan epidemiyolojik bir araştırmada, bir çiftlik tankındaki dökme süt örneğinden *S. aureus* LGA251 adı verilen yeni bir gen izole edilmiştir (10). Bu araştırma Birleşik Krallık’taki bir süt sığırcılığı sürüsünde tespit edilen metisiline dirençli *S. aureus*’un ilk raporu olma özelliği göstermektedir. İzolat oksasilin ve sefoksitine dirençli bulunmuş, ancak yapılan testlerde *mecA* geni ve PBP2a varlığı gösterilememiştir. Daha sonra, Wellcome Trust Sanger Enstitüsü, *S. aureus* LGA251 ‘in genom dizisini ortaya çıkarmış ve orijinal *mecA* ile yaklaşık % 69 sekans benzerliğine sahip yeni genin varlığını göstermiştir. Bu gen başlangıçta *mecA* LGA251 olarak adlandırılmış ve amino asit seviyesinde orijinal PBP2a’ya yaklaşık % 63 homoloji gösterdiği, bunun da *mecA* için PCR ile ve PBP2a için slayt aglütinasyonu ile tekrarlanan negatif testleri açıkladığı kanaatine varılmıştır. Bu *mecA* homologue, yani *mecA* LGA251, Stafilocok Kaset Kromozom Elemanlarının Sınıflandırılmasına İlişkin Uluslararası Çalışma Grubu (IWG-SCC) tarafından 2012 yılında *mecC* olarak yeniden adlandırılmıştır (11).

Garcia-Alvarez ve ark. yapmış olduğu çalışmada sadece süt sığırlarında değil aynı zamanda insanlarda da *mecC* pozitif izolatlar olduğunu göstermiştir (10). *MecA* gibi *mecC* de SCCmec üzerinde bulunmaktadır ve yine *mecC*, *mecA* gibi diğer stafilocok türlerinde de (*S. stepanovicii*, *S. xylosus* ve *S. sciuri*) bulunabilmektedir (68). Bugüne kadar, biri Fransa’da büyükbaş hayvan sütünden izole edilen *S. xylosus*’ta ve diğeri kemirgenler ve böcekçiller dahil olmak üzere küçük yabani memelilerden izole edilen *S. saprophyticus*’ta olmak üzere iki *mecC* allotipi bildirilmiştir. Bu allotipler, *mecC1* ve *mecC2*, *S. aureus* LGA251 deki *mecC* ile sırasıyla yaklaşık %93.5 ve %92.9 nükleotit sekans benzerliği göstermektedir. *mecC*’nin de *mecA* gibi koagülaz negatif stafilocoklardan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, bu konu hala tartışılmaktadır ve *mecC*- pozitif stafilocokların tüm genom dizisini içeren daha fazla araştırma, bu direncin kökeni ve evrimi hakkında yol gösterici olacaktır (69, 70).

2012’de Kim ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ilk kez *mecC* tarafından kodlanan *PBP2a*’nın β -laktam direncini belirlemedeki rolü gösterilmiştir. Bu çalışmada *mecA* ve *mecC* tarafından kodlanan *PBP2a*’nın özelliklerinde büyük farklılıklar olduğu ortaya konulmuştur. Çalışmada, *mecC* tarafından kodlanan *PBP2a*’nın, oksasiline sefoksitinden daha yüksek afinite gösterdiği, bunun aksine *mecA* tarafından kodlanan *PBP2a*’nın, oksasiline (MIC = 200 μ g/ml) kıyasla sefoksitine (MIC = 400 μ g/ml) karşı daha yüksek direnç gösterdiği bulunmuştur. Her iki proteinde de termostabilite ve optimum sıcaklık bakımından farklılıklar olduğu, *mecC* tarafından kodlanan *PBP2a*’nın, *mecA* tarafından kodlanan *PBP2a*’ya göre daha az kararlı olduğu gösterilmiştir. Çalışmada ortaya çıkan diğer bir şaşırtıcı durum ise, *PBP2a* *mecC*’nin transglikosilaz aktivitesine sahip olmamasına rağmen, *PBP2a* *mecA* gibi yüksek düzeyde oksasilin direnci sağlamak için doğal *PBP2*’nin varlığını gerektirmemesidir. Bunun nedeninin, monofonksiyonel glikotransferazlar ve *PBP2a* *mecC* arasındaki işbirliği olabileceği üzerinde durulmuştur. Çalışma, *mecC* tarafından kodlanan *PBP2a*’nın metisilin direncindeki rolünü ve ayrıca bir transpeptidaz olarak rolünü doğrulasa da, her iki proteinin performanslarında önemli farklılıklar vardır (71).

Her ne kadar *mecA* ve *mecC* tarafından kodlanan proteinler farklı biyokimyasal özelliklere sahip olsa da *mecC* yine metisilin direncini göstermektedir. Bu nedenle, bu suşların MRSA olarak doğru tanımlanması, klinik tanı açısından özellikle önemlidir. Antimikrobiyal duyarlılık testi kullanan laboratuvarlarda muhtemelen bu suşlar MRSA olarak doğru bir şekilde tanımlanacaktır; ancak, MRSA’nın tanımlanması ve doğrulanması için moleküler yöntemlerin kullanılması gerekliliği de ayrı bir problemdir. Laboratuvarlarda PCR ile *mecA* ve *mecC*’yi ayırt etmek için evrensel *mec* gen primerlerinin veya *mecC*’ye özel primerlerin eklenmesi gereklidir. Bu aynı zamanda *mecC* MRSA’nın süzveyans çalışmaları ve karakterizasyon için daha fazla suş izolasyonu açısından faydalı olacaktır. *mecC* MRSA’yı tespit etmek ve ayırt etmek için çeşitli PCR tabanlı yöntemler ve ticari PCR testleri artık mevcuttur. Ancak, *mecA* tarafından kodlanan *PBP2a* kullanılan ticari slayt aglütinasyon testleri *mecC* MRSA’yı MSSA olarak yanlış tanımlayacaktır. Bu nedenle *mecC* MRSA’nın tespiti gözden kaçırılmış olacaktır. Teşhis laboratuvarları tarafından *mecC* tarafından kodlanan *PBP2a*’nın tespiti için bu testleri güncellemesi veya modifiye test geliştirmesine ihtiyaç duyulmaktadır (72).

MRSA enfeksiyonları hastane kaynaklı (HK-MRSA) ve toplum kaynaklı (TK-MRSA) MRSA enfeksiyonu olarak ikiye ayrılmıştır (53). HK-MRSA enfeksiyonları risk grubunu yakın zamanda hastaneye yatan, bakım merkezlerinde uzun süre kalan, katater veya cerrahi girişim öyküsü bulunan kişiler oluşturmaktadır ve bu enfeksiyonlar genellikle daha dirençli olmaya meyillidir. TK-MRSA enfeksiyonları hastane ile ilişkisizdir ve genellikle yumuşak doku enfeksiyonu, pnömoni, sepsis kemik-eklem enfeksiyonları şeklinde ilerler (73).

TK-MRSA ve HK-MRSA ayırımı yapabilmek için CDC tarafından oluşturulmuş olan kriterler kullanılmaktadır. Buna göre toplum kaynaklı MRSA demek için;

- Hastaneye yattıktan sonraki ilk 48 saat içinde veya hastaneye yatıştan önce alınan kan kültüründe MRSA üremesi.
- Hastanın daha önceden MRSA ile kolonizasyonunun olmaması ya da MRSA enfeksiyonu geçirmemiş olması
- Son bir yıl içerisinde hastanede veya bakımevinde kalma, diyaliz, cerrahi öyküsü olmaması
- Kalıcı kateter veya transdermal medikal alet olmaması

Bu durumların tersi ise hastane kaynaklı MRSA enfeksiyonu tanısı koydurmaktadır (73).

S. sciuri'den kazanıldığı düşünülen mobil genetik eleman olan *SCCmec*'in bulunmasından kısa bir süre sonra birçok *SCCmec* alt tipi tanımlanmıştır ve bu *SCCmec* tipleri toplum ve hastane kaynaklı MRSA enfeksiyonlarında değişiklik göstermektedir. Büyük *SCCmec* tipleri (tip 1,2,3) HK-MRSA enfeksiyonlarında görülmektedir. Küçük *SCCmec* tipleri (tip IV,V) ise TK-MRSA enfeksiyonlarında görülmektedir ve metisiline duyarlı suşlardan aktarıldığı düşünülmektedir. *SCCmec* tip 1,2,3 çoklu antibiyotik direnç geni taşıırken, tipIV ve V sadece β -laktam antibiyotiklere direnç geni (*mecA*) taşır (74).

Başlangıçta HK-MRSA sadece sağlık bakımı yapılan merkezler ile ilişkilendirilmiş olup toplumda ortaya çıkmadığı biliniyordu ancak daha sonraları sadece sağlık bakım merkezlerinde görülmediği anlaşıldı. İlk kez 1980'lerde tanımlandıktan sonra giderek artan oranlarda toplum kaynaklı enfeksiyon etkeni olarak

izole edilmektedir ve bu da ciddi bir endişe kaynağıdır (75). Buna rağmen olayın sevindirici olan kısmı ise TK-MRSA'ların HK-MRSA'lara oranla β -laktam dışındaki antibiyotiklere daha az direnç geliştirmesidir. Ayrıca TK-MRSA'lar Panton-Valentine l kosidin (PVL)  retmektedir (76).

MecA ve *mecC* geni içermemesine rağmen oksasiline düşük düzeyde direnç gösteren bazı suşlar gösterilmiştir. Bu suşlar nadir görülmekle birlikte hangi yollarla direnç geliştirdiği tam olarak gösterilememiştir, ancak β -laktamazların fazla üretimi ve PBP lerde değişiklik geliştirmelerine bağlı direnç geliştirmiş olabileceği üzerinde durulmaktadır. Bu izolatlar için BORSA (borderline duyarlı *S.aureus*) tanımı kullanılmaktadır (77).

2.4.3 Vankomisin Direnci

Vankomisin ilk kez 1956'da *Streptomyces orientalis*'ten elde edilen, sadece gram pozitif bakteriler üzerinde etkinlik göstermesi nedeniyle dar spektrumlu olarak tanımlanan, bakterisidal bir antibiyotiktir. Ke fedilmesinin hemen ardından, yine aynı yıllarda enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılmaya ba lanmı tır. Yan etkilerinin fazla olması nedeniyle metisilin kullanıma girdikten sonra vankomisin kullanımı terk edilmiş ancak MRSA enfeksiyonlarının giderek artan sıklıkta rapor edilmesiyle tekrar kullanılmaya ba lanmı tır (78).

MRSA enfeksiyonu gelişen hastalarda vankomisin genellikle ilk tercih edilecek antibiyotik olarak önerilmektedir. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) rehberine göre vankomisin M  K değeri ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ olan suşlar duyarlı, 4–8 $\mu\text{g/ml}$ olan suşlar orta duyarlı, ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ olan suşlar dirençli kabul edilmektedir (79). Tedavide vankomisin kullanılacaksa tedavi başarısızlığını   lemek için minimum inhibitör konsantrasyonun (M  K) ≤ 1.5 $\mu\text{g/ml}$ olması tavsiye edilmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda vankomisin M  K değeri >1.5 $\mu\text{g/ml}$ olan hastaların vankomisin tedavisine cevabın daha kötü olduğu g  r  lm   tur (80). Metisiline dirençli stafilokoklar (hem koagülaz pozitif hem de negatif), *Clostridium difficile* ve enterokokların neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için vankomisin kullanımındaki dramatik artış, vankomisine dirençli stafilokokların ortaya çıkmasına neden olmuştur (81). Klinik bir izolatta, stafilokoklarda vankomisine karşı gelişen direnç ilk kez bir *Staphylococcus haemolyticus* su unda bildirilmiştir (82). Vankomisine orta düzeyde dirençli *S. aureus* (VISA) ilk kez 1997'de Japonya'dan bildirilmiş ve daha sonra diğer ülkelerden ek vakalar bildirilmiştir (14). VISA gelişen izolatların tamamının aynı zamanda MRSA

olduğu gösterilmiş ayrıca vankomisin tedavisi altındaki hastalardan olduğu görülmüştür (83). Son yıllarda vankomisine orta duyarlı *S. aureus* (VISA) ve vankomisine heterojen dirençli *S. aureus* (hVISA) dünya genelinde sıklıkla rapor edilmektedir (84). hVISA vankomisine duyarlı bir popülasyonda vankomisin MİK değeri daha yüksek alt grupların bulunması olarak tanımlanmaktadır. Bu alt grupların bulunma sıklığı yaklaşık olarak 10^4 - 10^6 'da 1'dir (85). Yapılan çalışmalar hVISA enfeksiyonlarının kalıcı bakteremi, tedavi başarısızlığı veya tedaviye zayıf bir cevapla ilişkili olduğunu göstermektedir (84).

VRSA'larda glikopeptidlere karşı görülen direnç mekanizması VISA ve hVISA'larda görülen mekanizmalardan farklıdır. VRSA'larda görülen direnç, enterokoklardan *vanA* geni içeren Tn1546 transpozonunun entegre olduğu plazmidin *S. aureus*'a aktarılmasıyla gerçekleşmektedir. Vankomisin, sentezlenmekte olan peptidoglikanın D-alanin-D-alanin ucuna bağlanır ve transpeptidasyon aşaması inhibe ederek hücre duvar sentezini engeller. *vanA* gen varlığında ise D-alanin-D-alanin yerine vankomisine afinitesi oldukça düşük olan D-alanin-D-laktat sentezlenir. Değişen öncül moleküllere vankomisin bağlanamaz ve hücre duvar sentezini inhibe edemez (86, 87).

VISA/hVISA'larda görülen dirençte ise izolatlar *vanA* geni içermeyip vankomisine daha düşük düzeyde direnç göstermektedir. Direncin mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte yapılan çalışmalar bu konuya ışık tutmaktadır. Çalışmaların çoğunda hVISA/VISA suşları ile hücre duvar kalınlaşması, otolizde azalma ve yüksek anyonik yüklerin azalması ilişkilendirilmiştir (88). Vankomisine karşı azalmış duyarlılığın peptidoglikan biyosentezindeki değişikliklerden kaynaklanıyor olduğu düşünülmektedir. VISA suşlarında, düzensiz şekilli, kalınlaşmış hücre duvarları ile sonuçlanan ek miktarlarda sentezlenmiş peptidoglikan olduğu gösterilmiştir. Daha fazla D-Ala-D-Ala kalıntısının açığa çıkmasına yol açan peptidoglikan ipliklerinin çapraz bağlanmasında da azalma vardır (89). Değişen çapraz bağlanma, pentapeptid köprüsünde d-glutamatın amidasyonu için mevcut olan azaltılmış L glutamin miktarlarından kaynaklanmaktadır. Sonuç olarak, vankomisini bağlamak ve yakalamak için daha fazla D-Ala-D-Ala artışı oluşmakta, bağlanan vankomisin daha sonra ilaç moleküllerinin sitoplazmik membrandaki hedeflerine ulaşmasında başka bir engel olarak hareket etmektedir (90).

Ayrıca, hVISA/VISA fenotiplerinin, iki bileşenli sistemin (TCS) *vraSR* (vankomisin direnci ile ilişkili sensör/regülatör), *graSR* (glikopeptid direnci ile ilişkili

sensör/regülatör) ve walKR (sensör protein kinaz/regülatör) genlerindeki mutasyonlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir(91).

2.4.4 Kinolon Direnci

Florokinolonlar 1980'li yıllarda Gram-negatif bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaya başlanmakla birlikte Gram-pozitif bakteriyel enfeksiyonlara da etkili olması nedeniyle, pnömokok ve stafilokokların neden olduğu enfeksiyonların da tedavisinde kullanılmıştır. Zamanla kinolon direncinin metisiline dirençli *S. aureus* suşları arasında daha hızlı ve belirgin bir şekilde ortaya çıktığı görüldü. Bu nedenle kinolonların stafilokok enfeksiyonlarındaki kullanımı zamanla azaldı (92).

Florokinolon direnci, topoizomera IV veya DNA giraz hedefindeki spontan kromozomal mutasyonların bir sonucu olarak veya çok ilaçlı bir dışa akış pompasının indüksiyonu ile gelişmektedir. Kinolonlar, diğer bakteriyel patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi için kullanıldığında, *S. aureus* ile kolonize olan hastaların (örneğin, ciltlerinde veya mukozal yüzeylerinde) subterapötik antibiyotik konsantrasyonlarına maruz kaldığı ve bu nedenle dirençli mutantlarla kolonileşme riski altında olduğu düşünülmektedir (92) . Bu yerleşik, dirençli türler daha sonra oluşacak enfeksiyonlar için rezervuar haline gelir. Høiby vd.'nin yapmış olduğu bir çalışmada siprofloksasin tedavisinin, hem siprofloksasin hem de metisiline dirençli, burun ve deriyi kolonize eden koagülaz negatif stafilokok suşlarının oranını hızla artırdığı gösterilmiştir. *S. aureus* da kommensal floranın bir parçası olduğundan benzer bir durum bu bakteri için de geçerlidir (93).

Kinolonlara direnç, kromozomal mutasyonların aşamalı olarak edinilmesinden kaynaklanır. Yüksek bakteri yoğunluğu, dirençli alt popülasyonların önceden varlığı ve bazen stafilokokal enfeksiyonların tedavisinde düşük dozlarda kullanılan kinolonlar, dirençli mutantların seçimine yol açan bir ortam yaratır. Kinolonlar, DNA süper sarmalını açan DNA giraz ve birleştirilmiş DNA ipliklerini ayıran topoizomera IV üzerinden etkinlik göstermektedir. Enzim-DNA kompleksinin kritik bölgelerindeki amino asit değişiklikleri [kinolon direnci-belirleme bölgesi (QRDR)], her iki hedefi için kinolon afinitesini azaltır. ParC alt birimi (GrlA in *S.aureus*) topoizomera IV ve girazdaki GyrA alt birimi, direnç mutasyonlarının en yaygın bölgeleridir; topoizomera IV mutasyonları, stafilokoklarda birincil ilaç hedefleri oldukları için en kritik olanlardır (92). Tek amino asit mutasyonları bazen klinik direnç kazandırmak için yeterlidir, ancak daha aktif florokinolonlar için ek mutasyonlar gerekli görünmektedir. Direnç

mutasyonları QRDR sitelerinde birikerek direnç seviyelerini artırabilir. Her iki hedefin de direnç mutasyonlarına sahip olması oldukça yaygındır. *S.aureus*'ta ek bir direnç mekanizması, çoklu ilaca dirençli dışa akım pompası NorA'nın indüksiyonudur. *S. aureus*'ta bu pompanın çalışmasındaki artış düşük düzeyde kinolon direnci ile sonuçlanabilir (94).

Daha yeni florokinolonlar (moksifloksasin gibi 8-metoksikinolonlar), siprofloksasine dirençli stafilokoklara karşı in vitro etkili olmakta ve dirençli mutantları seçme olasılığı daha düşük görünürken, in vivo etkinlik gösterip göstermeyeceği net değildir (95). Entenza vd. yapmış olduğu bir çalışmada siprofloksasine dirençli *S. aureus* suşlarında moksifloksasin MİK değerleri düşük olmakla birlikte endokarditli bir hastanın tedavisinde etkili olmadığı görülmüştür. Bu durum, in vitro duyarlılık testi ile in vivo terapötik etkinlik arasında potansiyel bir eşitsizlik olduğunu göstermektedir (96).

2.4.5 Daptomisin Direnci

İkinci en önemli anti-MRSA ilacı, lipopeptid antibiyotik sınıfına ait olan daptomisin. Daptomisin, hücre zarının depolarizasyonuna ve destabilizasyonuna neden olan hücre zarını hedefleyerek bakteri öldürücü etkinlik gösterir. Diğer pek çok ilaç hücrenin parçalanmasına yol açar böylelikle bakteriyel endotoksinler ve diğer inflamatuvar bileşenler dolaşıma katılır ve sonuç olarak sitokinler devreye girerek hastada çoklu organ yetmezliği ve septik şok tabloları gelişebilir. Ancak daptomisin hücre parçalanmasına neden olmadan kollapsa yol açar ve bu nedenle bakteriyel içerik dolaşıma katılmaz ve septik şok tablosu görülmez bu da diğer antibiyotiklere bir üstünlüğüdür (97, 98). Cafiso ve ark.'na göre *dltABCD* genleri, daptomisin azaltılmış duyarlılığı için ortak bir yoldur, *mprF* gen mutasyonu ise sadece test edilen belirli suşlarda ifade edilmiştir (99). Azalmış daptomisin duyarlılığı ile ilişkili olan bir başka önemli gen mutasyonu, RNA polimeraz alt birimleridir (*rpoB*). Bugüne kadar bir salgın olmaması nedeniyle daptomisin direnci insidansının nadir olduğu düşünülmektedir (100).

2.4.6 Tigesiklin Direnci

Tigesiklin, geniş spektrumlu, cilt, yumuşak doku ve intraabdominal enfeksiyonların tedavisinde kullanılan minosiklin antibiyotik sınıfındaki ilk yarı sentetik antibiyotiktir (101).

30S ribozomal alt üniteye bağlanarak protein sentezini engellemesiyle tetrasikline benzerlik göstermektedir. Direnç gelişimini göstermek amacıyla yapılan çalışmalar *mepA* geninde artış ve *mepR* geninde azalmayla sonuçlanan *mepR* ve *mepA* genlerindeki mutasyonların MRSA’larda dışarı eflux pompasının aşırı çalışmasına neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca, bu çalışmalarda ribozomal protein S10’da da mutasyon olduğu görülmektedir (101).

2.4.7 Linezolid Direnci

Linezolid, oksazolidinon grubunda yer alan, bakteriyostatik etkili sentetik bir antimikrobiyal ajandır. 50S ribozomal alt ünitesinin 23S rRNA’sına bağlanarak 30S başlama kompleksiyle birleşir ve 70S başlangıç kompleksinin oluşumunu engeller. Linezolidin 50S alt ünitesindeki bağlanma bölgesi kloramfenikol ve linkomisinle çok yakın olmakla birlikte linezolid peptid bağı oluşumunu engellemediği için bu ilaçlarla çapraz reaksiyon görülmez. VRE, MRSA, VISA ve VRSA dahil olmak üzere gram-pozitif koklar üzerinde güçlü etkinliğe sahiptir (102).

Linezolid, toplum ve hastane kaynaklı pnömonilerin ve deri-yumuşak doku enfeksiyonlarının tedavisinde, diyabetik ayak ve bakteremi tedavisinde kullanılmak üzere 2000 yılında FDA tarafından onay almıştır. Özellikle MRSA kaynaklı ventilatör ile ilişkili pnömoni (VİP) olgularının tedavisinde önemli bir yere sahiptir. Yapılan çeşitli çalışmalarda MRSA’nın neden olduğu hastane kaynaklı pnömoni ile VİP olgularında linezolid ile tedavi sonucunda vankomisine oranla daha iyi klinik sonuçlar alındığı gösterilmiştir (103).

Hastane ve toplum kaynaklı MRSA izolatlarında linezolid direncine rastlanmakla birlikte bu oran hala düşüktür (102). Linezolid direnci genellikle derin organ tutulumu, yabancı cisim varlığında veya uzun süreli linezolid tedavisi alan hastalarda görülmektedir (104). Yapılan çalışmalarda, ABD ve diğer ülkelerde *S. aureus* izolatlarında linezolid direnci < %0.1 olarak belirlenmiştir(105). Ülkemizde MRSA izolatlarında yapılan çeşitli çalışmalarda linezolid direnci saptanmamıştır (106).

Direnç mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte 23S rRNA’nın beşinci bölgesinde meydana gelen nükleotid değişiklikleri sonucunda direncin ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu değişiklikler genellikle 23rRNA’da bulunan 2576 pozisyonundaki aminoasitte görülür ve linezolidin hedef bölgeye bağlanması güçleşir (107). *S. aureus*’larda en sık G2576T mutasyonu saptanmıştır. Bunun dışında

T2500A, T2504, G2242A ve G2603T mutasyonları da tanımlanmıştır. *S. aureus*'larda 23S rRNA'nın beş ya da altı kopyası bulunmaktadır. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar arttıkça linezolid MİK değerlerinde artış görülmektedir. Hatta linezolid kullanım süresi ile rRNA genlerinin mutasyona uğraması arasında doğru orantılı bir ilişki saptanmıştır (105).

Ayrıca plazmid aracılı *cfr* geninin aktarılması sonucunda da stafilokoklarda linezolid direnci gelişebilmektedir. Cfr, 23S rRNA'nın A2503 bölgesinin metilasyonuna yol açar. Bu değişiklik sonucunda fenikol, linkozamid, oksazolidinon, plöromutilin ve streptogramin A gibi farklı antibiyotik gruplarının hedef bölgeye bağlanması engellenmiş olur (109). Günümüzde *cfr* geni nedeniyle linezolide dirençli *S. aureus* izolatlarıyla ortaya çıkan hastane kaynaklı salgınlar bildirilmiştir (110).

2.4.8 Streptogramin Direnci

Streptograminler, *Streptomyces pristinaspiralis*'ten elde edilen antibiyotiklerdir. Kinupristin %30 -dalfopristin %70 oranda olmak üzere, birlikte sinerjik etkili iki farklı yarı sentetik streptogramin bileşiğinin kombinasyonudur. Kinupristin (streptogramin B) ve dalfopristin (streptogramin A) bir arada genellikle bakterisidal etki gösterir. 50S ribozomal alt ünitenin farklı bölgelerine bağlanarak protein sentezini irreversible inhibe eder. Gram-pozitif bakteriler üzerinde etkinlik göstermesine rağmen *Enterococcus faecalis*'e etkinliği yoktur (111, 112).

Ribozoma bağlanma bölgesinde yapısal değişiklik, ilacın enzimatik inaktivasyonu ve ilacın dışa atımı gibi yollarla streptograminlere direnç gelişimi gerçekleşmektedir. Ribozomal bölgede meydana gelen değişim en sık karşılaşılan direnç mekanizmasıdır. En yaygın mekanizma, 23S rRNA ribozomal alt ünitesi içindeki adenin metillenmesinin bir sonucu olarak ribozomların, stafilokoklarda bulunan *erm* genleri (*ermA* ve *ermC*) tarafından, ağırlıklı olarak *ermC*, kodlanan bir metilaz tarafından modifikasyonudur. Ribozomdaki konformasyonel değişiklikler, tüm MLS_B antibiyotiklerinin azalmış bağlanması ile sonuçlanır ve bu suşlar tüm MLS_B antibiyotiklerine (makrolidler, linkozamidler ve streptograminlere) dirençlidir. Transpozon ya da plazmid aracılı aktarım olabilir. MLS_B direnci yapısal ya da indüklenebilir olabilir (113). Yapısal dirençte (cMLS_B) rRNA metilaz devamlı üretilir, indüklenebilir dirençte (iMLS_B) ise sadece indükleyici ajan varlığında metilaz üretilir. iMLS_B'nin tespiti için özel bir disk difüzyon yöntemi olan D-testi geliştirilmiştir. Bu testte, bir klindamisin diskinin yakınına bir eritromisin diski

yerleştirilir. İMLS_B dirençli suşlarda, klindamisine direnç, eritromisinin agardan difüzyonu ile indüklenir ve eritromisin diskine (D-şekilli bir bölge) bitişik klindamisin inhibisyon bölgesinin düzleşmesine yol açar, klindamisin diskinin eritromisine bakmayan kısmında dairesel bir bölge oluşur (114). Yapılan çalışmalarda, stafilokoklarda %0-31 arasında değişen oranlarda kinupristin/dalfopristin direnci saptanmaktadır (115). Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise bu oran %0-5 arasında belirlenmiştir (116).

2.4.9 Seftobiprol Direnci

Seftobiprol, parenteral olarak uygulanan bir pirolidinon-3-iliden-metil sefalosporindir. MRSA'ya, diğer Gram-pozitif bakterilere (*S. pneumoniae* ve *Enterococcus faecalis*) ve Gram-negatif bakterilere (*Enterobacterales* ve *P.aeruginosa*) karşı temel peptidoglikan transpeptidazların inhibisyonu yoluyla etkinlik gösteren geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Diğer sefalosporinler gibi, seftobiprolün PBP'lere bağlanması hücre duvarı sentezine müdahale ederek hücre büyümesini inhibe eder ve nihayetinde bakteri hücresi ölümüne yol açar. Bu nedenle bakterisidal etkinlik gösterir (117). MRSA'ların neden olduğu deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, hastane ve toplum kökenli pnömonilerin tedavisinde %90 civarında etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (118). Beta-laktam direncine yol açan PBP2a ve PBP2x'e yüksek afinite gösterir (119). Oral emilimi iyi olmayan bu antibiyotik parenteral yolla uygulanmakta olup postantibiyotik etkisi 30 dakika kadar sürmektedir (120).

2.4.10 Seftarolin Direnci

Seftarolin, PBP2a'yı inhibe edebilen yeni bir geniş spektrumlu sefalosporindir. Anti-MRSA aktivitesi yaklaşık 1-2 µg/ml'lik bir MIC₉₀ gösterir. Komplike cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarının ve toplum kökenli pnömoninin tedavisi için onaylanmıştır (121). Birkaç çalışma, sporadik vakalarda MRSA'nın seftaroline duyarlılığının azaldığını (EUCAST MIC değerleri > 1 µg / ml veya CLSI MIC ≥ 4 µg / ml) ve spesifik sekans türleri (ST'ler) ile sınırlı olduğunu göstermiştir (122). Son zamanlarda, seftarolin ile tedavi edilen sürekli MRSA bakteremi sırasında yüksek düzeyde seftarolin direnci (MIC > 32 µg / ml) gözlenmiştir (123). Seftaroline düşük seviyeli direnç, hem allosterik alanda (N146K, E150K, N204K, E239K, G246E) hem de transpeptidaz alanında (H351N, Y446N, E447) bulunan PBP2a'daki mutasyonlarla ilişkilidir (122, 123, 124).

Yüksek seviyeli seftarolin direnci, aktif bölge geometrisini değiştiren transpeptidaz alanındaki mutasyonlarla açıklanabilirken, allosterik bölgedeki mutasyonlarla ilişkili düşük seviyeli direnç, aktif bölgenin yeni bir allosterik modülasyonu ile açıklandı (125, 126). Seftarolin, terapötik konsantrasyonlarda PBP2a allosterik bölgeye bağlanır ve ikinci bir seftarolin molekülü tarafından aktif bölgenin açılmasını ve asilasyonunu tetikler (127). PBP2a allosterik alandaki mutasyonlar, tetikleme mekanizmasını değiştirir ve muhtemelen peptidoglikan biyosentezi için gereken protein-protein etkileşimlerini etkiler (127, 128). Şaşırtıcı bir şekilde, seftarolinin ticari girişinden önce klinik *S. aureus* izolatlarında ve seftarolinin ticari olarak mevcut olmadığı ülkelerde azalmış duyarlılık gösterilmiştir (122, 129, 130).

2.5 *Staphylococcus aureus* İzolatlarını Tanımlama Yöntemleri

S. aureus izolatları normal atmosferik şartlar altında $35\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 18 ± 2 saatlik inkübasyon sonrasında KKA'da sarı renkli, 1-4 mm çapında, parlak, düzgün kenarlı koloniler şeklinde görülmektedir.

2.5.1 Gram Boyama

KKA'da $35\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 18 ± 2 saatlik inkübasyon sonunda üreyen koloniler steril tek kullanımlık öze yardımıyla alınır ve temiz bir lam üzerinde serum fizyolojik ile süspanse edilir. Lam sabit bir alev kaynağından geçirilerek tespit işlemi yapılır. Tespit edilen lam sırasıyla kristal viyole, lugol, etil alkol ve sulu fuksin boyalarıyla boyanır. Lam kuruduktan sonra 100'lük büyütmede ışık mikroskobu altında incelenir. Stafilokok kolonileri üzüm salkımı şeklinde ve mor renkte (Gram pozitif) görülür (19, 20).

2.5.2 Katalaz Testi

Stafilokokları, streptokok ve enterokoklardan ayırmada kullanılan testtir. Katalaz, toksik hidrojen peroksit ve serbest radikallerin zararlı etkisine karşı bakteriyi korur. Katalaz enzimine sahip olan bakteriler %3'lük hidrojen peroksidi su ve oksijene dönüştürür ve sonuç olarak gaz kabarcığı gözlemlenir. Eritrositler de katalaz aktivitesi sergileyebileceğinden katalaz testi kanlı agardan yapılmamalıdır. Ancak koyun kanlı agardan katalaz testi yapılacaksa yanlış pozitifliği önlemek için koloninin olabildiğince üst kısımdan alınmasına dikkat edilmelidir (19, 20).

2.5.3 Koagülaz Testi

2.5.3.1 Lam Koagülaz Testi

Çoğu *Staphylococcus aureus* kolonilerinde hücre duvarına bağlı olarak bulunan koagülaz veya kümeleşme faktörü (clumping faktör) plazmada bulunan fibrinojen ile etkileşime girip fibrinojeni fibrine çevirerek kümeleşmeye yol açar. Ancak *Staphylococcus aureus* dışında *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi subs. schleiferi* de kümeleşme faktörüne sahiptirler ve lam koagülaz testi pozitif çıkabilir. Tuz içeriği yüksek besiyerleri *Staphylococcus aureus*'ta otoaglutinasyona neden olabileceğinden kullanılmamalıdır. Lam koagülaz testi negatif çıkması kolonilerin kümeleşme faktörü içermediği anlamına gelir. Ancak hücre dışına salınan koagülaz enzimi içerip içermediği test edilmelidir. Bu amaçla tüp koagülaz testi yapılmalıdır (19, 20).

2.5.3.2 Tüp Koagülaz Testi

Çoğu *Staphylococcus aureus*'ta bulunan ve hücre dışına salınan koagülazı test etmede kullanılan bu yöntem lam koagülaza göre daha güvenilirdir. Koagülaz fibrinojenle etkileşime girerek fibrinojeni fibrine dönüştürür. Plazma içeren tüplerde süspanse edilen koloniler 35°C'de inkübe edilerek 4. ve 18-24. saatin sonunda pıhtı oluşumu açısından değerlendirmeye alınır. 35°C'de uzun inkübasyon sırasında dikkatli olunmalıdır çünkü salınan fibrinolizin fibrini eritip yanlış negatif değerlendirmeye yol açabilir. *Staphylococcus aureus* dışında insanlarda nadiren enfeksiyona yol açan bazı hayvan kaynaklı stafilokoklarda da (*S.intermedius*, *S.hyicus*, *S.delphini*, *S.schleiferi subs. coagulans*) tüp koagülaz testi pozitif çıkmaktadır. Bazı *Staphylococcus aureus* kolonileri tüpte zayıf pozitiflik oluşturabilir ya da nadiren koagülaz testi negatif olabilir (19-20).

2.5.4 Deoksiribonükleaz Testi

DNaz'lar DNA'yı parçalayarak nükleotid ve fosfat açığa çıkaran ekstrasellüler endonükleazlardır. İndikatör olarak toluidin mavisi içeren besiyeri test için kullanılır. Bakteri nokta ekimi şeklinde besiyerine ekilir ve 35 °C de 24 saat inkübe edilir. Bakterinin tüm plağa yayılarak ekimi renk değişimi gözlemlenmesini zorlaştıracığı için önerilmemektedir. Koloni etrafındaki rengin maviden pembeye dönmesi bakterinin DNaz enzimine sahip olduğunu gösterir. Yüksek konsantrasyonlarda indikatör madde içeren besiyerleri bakteri üremesini engeller ve DNaz aktivitesi görülemez (19, 20).

2.5.5 Isıya Dirençli Endonükleaz Testi

DNaz testi gibi toluidin mavisi içeren besiyeri kullanılır. Önce besiyeri yüzeyine steril bir araçla delikler açılır, 15 dakika su banyosunda kaynatılan buyyon kültürü ile besiyeri yüzeyine açılan delikler doldurulur. 35 °C de 24 saat inkübe edilen koloniler değerlendirmeye alınır. *Staphylococcus aureus* kolonileri ile doldurulan deliklerin etrafında pembe renk oluşması bakterinin ısıya dirençli endonükleaz enzimi bulundurduğunu gösterir. Bazı hayvan kaynaklı stafilokoklarda da (*S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. caprea*, *S. schleiferi*) ısıya dirençli termonükleaz bulunmakta ve bazı stafilokoklarda da (*S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. carnosus*) test zayıf pozitiflik göstermektedir. Bu testin doğruluğu *Staphylococcus aureus* için özgüllüğü %100 olan PCR ile test edilebilmektedir. PCR ile ısıya dirençli termonükleaz enzimini kodlayan *nuc* genine bakılmaktadır (16, 19, 20).

2.5.6 Mannitol Fermantasyonu

Staphylococcus aureus kolonileri mannitolü fermente ederek asit açığa çıkarır ve bu asit de indikatör fenol kırmızısıyla etkileşime girerek besiyerinin rengini sarıya çevirir. Bu test epidemiyolojik araştırmalarda ve nazal *S. aureus* taşıyıcılığını göstermede kullanılır. Mannitol tuz agarda %1 mannitol, % 7.5 sodyum klorür, fenol kırmızısı ve pepton bulunmaktadır. İçerdiği yüksek tuz miktarı nedeniyle çoğu bakteri bu besiyerinde üreyememektedir. Enterokoklar ve nadiren bazı stafilokoklar da bu besiyerinde üreyebileceğinden tanı diğer testlerle desteklenmelidir (19-20).

2.5.7 Kütle Spektrometrisi Temelli Yöntemler

“Matriks destekli lazer dezorpsiyon iyonizasyon-uçuş süresi kütle spektrometrisi (matrix-assisted laser deabsorption/ionization-time of flight mass spectrometry; MALDI-TOF MS) adı verilen bu yöntemde ilgili koloni metal plak üzerindeki alana sürüldükten sonra üzerine 1 µl matriks solüsyonu (10 mg/ml α-siyano-4-hidroksisinamik asit, %50 asetronitril, %2,5 trifloroasetik asit) pipetlenerek oda şartlarında kurumaya bırakılır. Metal plak, kütle spektrometri cihazı içine yerleştirilip lazer ışınları ile vuruşlar yapıldıktan sonra matriks varlığında bakteri ilgilenilen moleküllerine (DNA, protein vb) ayrıştırılır. Proteinlerin hepsi +1 yükle yüklenir, böylece uçuşları süresince sadece kütlelerinin farklılıkları ile analizöre ulaşırlar. En uygun matriks maddeleri, aromatik moleküllerdir. (131).

3. MATERYAL VE METOD

Çalışmamıza 2015-2020 yılları arasında laboratuvarımıza gönderilen çeşitli örneklerden izole edilip -80 °C’de stoklanmış 68 adet MRSA suşu dahil edildi.

3.1 İzolatların Canlandırılması

İzole edilen MRSA suşları stoktan çıkarıldıktan sonra oda sıcaklığında çözünmesi beklendi. Çözünen MRSA izolatları steril, tek kullanımlık plastik öze kullanılarak tek koloni düşürme tekniği ile %5 koyun kanlı agar (KKA) plağına pasajlandı. Bu plaklar $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ’lik etüvde 18 ± 2 saat inkübe edildi. 18 saatin sonunda değerlendirmeye alınan plaklardaki kolonilerin tek koloni pasajları yapıldı.

3.2 Mikrobiyolojik Kültür ve Tanımlama

Canlandırılarak tek koloni ekimleri yapılan izolatlara öncelikle Gram boyama yapılmıştır. Gram boyamada üzüm salkımı şeklinde kümeler oluşturmuş gram pozitif kok kolonileri steril bir öze yardımıyla bir lam yüzeyine yayılmış ve üzerlerine % 3’lük H_2O_2 damlatılmıştır. H_2O_2 ile muamele sonrasında gaz kabarcığı oluşturan kolonilere stafilokok olarak ön değerlendirmede bulunulmuştur. Suşların ileri tiplendirilmesi için MALDI-TOF MS (BioMérieux, Fransa) kullanılmıştır. MALDI-TOF MS sonucuna göre *S. aureus* olan izolatlar çalışmaya dahil edilmiştir.

3.3 İzolatların Metisilin Direncinin Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi İle Belirlenmesi

Canlandırılan *S. aureus* izolatlarından steril öze yardımıyla alınarak Serum Fizyolojik içerisinde 0,5 McFarland bulanıklığında bir süspansiyon hazırlandı. Daha sonra bu süspansiyon steril eküvyon ile Mueller-Hinton agar yüzeyine homojen bir şekilde yayıldı ve besiyeri yüzeyine 15 dakika içerisinde sefoksitin 30 µg içeren diskler yerleştirilerek $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta ve 18 ± 2 saat normal atmosferik koşulları sağlayan etüvde inkübe edildi. Bu süre zarfının sonunda sefoksitin disk zon çapı koyu bir zemin üzerinde ve ışıklandırılmış bir ortamda cetvelle belirlendi. Elde edilen zon çapı değerleri EUCAST uluslararası antimikrobiyal duyarlılık rehberine göre değerlendirildi. Sefoksitin (30 µg disk) zon çapı <22 mm olan suşlar metisiline dirençli olarak (MRSA) kabul edildi (132).

3.4 Broth Mikrodilüsyon Yöntemiyle Vankomisin MİK değerinin Belirlenmesi

Kanlı agar besiyerinde bir gece inkübe edilen kolonilerden steril öze yardımıyla alınarak SF içerisinde 0,5 McFarland yoğunlukta bakteri süspansiyonu elde edildi. 10 ml Mueller-Hinton broth besiyerinden 100 µl dışarıya atılıp 100 µl bakteri süspansiyonu eklenerek bir inokulum hazırlandı. Vankomisin toz flakondan steril distile su içinde 128 µg/ml konsantrasyonda vankomisin antibiyotik çözeltisi hazırlandı. Broth mikrodilüsyon için 96'lık U tabanlı plateler kullanıldı. Mikrodilüsyon yapım aşamaları: mikroplağın yatay kuyucuklarının hepsine 50'şer µl Mueller-Hinton broth eklendi. 128 µg/ml konsantrasyonda vankomisin antibiyotik çözeltisinden 50 µl pipetlenerek ilk kuyucuğa konuldu. Birinci kuyucuktan 50 µl alınıp ikinciye, ikinci kuyucuktan aynı miktar alınıp üçüncüye ve bu şekilde 11. kuyucuğa kadar seri dilüsyon yapıldı. On ikinci kuyucuk pozitif kontrol olarak kullanıldı ve bu kuyucuğa antibiyotik eklenmedi. Hazırlanan inokülüm vortekslelendikten sonra bu süspansiyondan her bir kuyucuğa 50'er µl eklendi. Mikroplağın üzeri steril bir kapakla kapatıldıktan sonra 35±1°C'de 18 saat inkübe edildi. 18 saatlik inkübasyon sonunda çıplak gözle değerlendirme yapıldı ve yatay ekseninde üremenin olmadığı en düşük antibiyotik konsantrasyon değeri MİK değeri olarak kabul edildi. MRSA izolatlarının vankomisin duyarlılık kategorileri EUCAST v 11.0'de belirtilen klinik duyarlılık sınır değerlerine göre belirlendi. Vankomisin için $MİK \leq 2$ mg/l bulunan izolatlar duyarlı olarak kabul edildi (132).

3.5 Vankomisin Agar Tarama

6 µg/mL vankomisin içeren agar tarama öncelikle Mu3 (ATCC 700698), Mu50 (ATCC 70699) ve ATCC 29213 *S. aureus* standart suşlarında ayrı ayrı test edildi. Mu50 (ATCC 70699) 24. saatte ürerken, ATCC 29213 *S. aureus* ve Mu3 (ATCC 700698) suşlarında üreme gözlemlenmedi. 48. saatte ATCC 29213 *S. aureus* üremedi ancak 48. saatin sonunda Mu3 (ATCC 700698) suşu da üremediği için uygun dozun bulunması amacıyla 0.5,1.2.4,6 µg/ml vankomisin içeren beyin kalp infüzyon agara sırasıyla standart suşların ekimi yapıldı ve 24. saatin sonunda Mu50 (ATCC 70699) suşunun ürediği, 48. saatin sonunda Mu3 (ATCC 700698) suşunun ürediği ve bu sürenin sonunda ATCC 29213 *S. aureus* standart suşlarının üremediği vankomisin 2 µg/ml tarama konsantrasyonu olarak belirlendi. Bu yöntem, 2 µg/mL vankomisin içeren beyin kalp infüzyon agar besiyeri kullanılarak yapıldı. Bunun için 2 µg/ml vankomisin içeren beyin-kalp infüzyon (BHI) agar plakları hazırlandı. Koyun kanlı agarda 18±2 saatlik

inkübasyon sonunda üreyen kolonilerden steril öze ile alınarak 0,5 McFarland bulanıklığına eşdeğer bakteri süspansiyonu hazırlandı. Süspansiyondan 10 µl alınarak 2 µg/ml vankomisin içeren beyin-kalp infüzyon agar plaklarına ekildi, normal atmosferik koşullarda, 35°C’de 24 ve 48 saat inkübe edildi. Plaklar ilk 24 saatin sonunda değerlendirmeye alındı. 24. saatin sonunda üreme görülen plaklardaki izolatlar potansiyel VISA olarak değerlendirildi. Değerlendirme işlemi tamamlanan plakların inkübasyonuna devam edildi ve 48. saatin sonunda ikinci değerlendirmeye alındı. 48 saat sonunda plaklarda üreme görülürse izolat olası hetero- VISA olarak değerlendirildi. 48 saat sonunda üreme görülmeyen suşlar vankomisine duyarlı olarak değerlendirildi. Çalışmada, hVISA pozitif kontrol suşu olarak Mu3 (ATCC 700698), VISA kontrol suşu olarak Mu50 (ATCC 70699) ve MSSA suşu olarak ATCC 29213 *S. aureus* standart suşları kullanılmıştır (133).

3.6 MRSA İzolatlarında Makro E-Test Yöntemi İle hVISA Varlığı Taranması

MRSA kökenlerinde hVISA varlığı Wootton ve arkadaşlarının uyguladığı makro E-test (MET) yöntemi ile taranmıştır (134). Bu amaçla, KKA’da 18 saatlik inkübasyon sonunda üreyen bakteri kolonilerinden alınarak MHB içerisine eklendi ve 2,0 McFarland bulanıklığında süspansiyon hazırlandı. Hazırlanan bakteri süspansiyonundan pipetle 100 µl alınarak 90 milimetrelilik petri kaplarına hazırlanmış beyin-kalp infüzyon (brain-heart infusion; BKİ) agar yüzeyine bırakıldı ve steril öze yardımıyla besiyeri yüzeyine yayıldı. Plakalar biyogüvenlik kabininde yaklaşık 15 dakika kurumaya bırakıldı. Plaklarının üzerine vankomisin E-test stripleri (BioMérieux, Fransa) bırakıldı. 35°C’de normal atmosferik koşullar altında inkübe edilen plaklar 24 ve 48 saat sonunda değerlendirmeye alındı. 48 saat sonunda vankomisin için MİK ≥ 8 mg/l tespit edilen izolatlar hVISA şüpheli izolat şeklinde değerlendirildi (130). Çalışmada, hVISA pozitif kontrol olarak Mu3 (ATCC 700698), VISA kontrol suşu olarak Mu50 (ATCC 70699) ve MSSA suşu olarak ATCC 29213 *S. aureus* standart suşları kullanılmıştır.

3.7 MRSA İzolatlarında hVISA, VISA Varlığının Populasyon Profili Analizi- Eğri Altında Kalan Alan (Population Profile Analysis-Area Under The Curve; PAP-AUC) Yöntemi İle Araştırılması

Wootton ve arkadaşlarının çalışmış olduğu yöntem kullanılarak PAP-AUC yapılmıştır (135). 18 saatlik inkübasyon sonunda KKA’da üreyen MRSA izolatlarından steril öze yardımıyla alınarak 0.5 MacFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bu bakteri süspansiyonlarından alınarak 10 kat seri dilüsyonları yapıldı ve

10^3 , 10^6 konsantrasyonlarda bakteri süspansiyonları elde edildi. Seri süspansiyonlar, VISA ve hVISA şüpheli olan her izolat için ayrı ayrı hazırlandı. Hazırlanan bu süspansiyonlardan 100 µl alınarak 0,25; 0.5; 1; 2; 4 ve 8 mg/L vankomisin içeren BKİ agara ekildi. Ekimi yapılan plakların tamamı 35°C'de 48 saatlik inkübasyon için etüve yerleştirildi. 48 saatlik inkübasyonun sonunda her plakta oluşan koloniler sayılarak not edildi. Her bir MRSA izolatı için vankomisin konsantrasyonuna karşı gelen mililitredeki koloni sayısının logaritması göz önünde bulundurularak grafikler çizildi (131). Bu grafikte her suş için elde edilen eğri altında kalan alan yamuk kuralı (trapezoid rule) kullanılarak hesaplandı. hVISA standart suşu için Mu3 (ATCC 700698) ve MSSA standart suşu için ATCC 29213 kullanıldı. Daha sonra her bir suşun ve 10 katlık seri sulandırımının eğri altında kalan alan (AUC) değeri, Mu3 kontrol suşu için aynı şekilde hesaplanan AUC değerine oranlandı. Bu oran ≤ 0.90 ise vankomisine duyarlı stafilokok, 0.90-1.3 ise hVISA, ≥ 1.3 ise VISA olarak kabul edildi (135).

3.8 MRSA İzolatlarında Moleküler Temelli Testler

3.8.1 MRSA İzolatlarından DNA'nın Elde Edilmesi

Stoktan çıkarılan MRSA izolatları Mueller-Hinton agar besiyerine ekildi ve 35°C sıcaklıkta 24 saat normal atmosfer şartlarında inkübe edildi. 24 saatin sonunda üreyen kolonilerden 1 öze dolusu alınarak 500 µl steril serum fizyolojik içerisine eklenerek karıştırıldı. Vorteksleme işleminin ardından örnekler 15 dk sonografik işleme tabi tutuldu. 1800 µl AVE buffer eklenen örneklerden DNA izolasyonu QIA Symphony Otomatize DNA Ekstraksiyon Cihazında (Qiagen, Almanya) QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Almanya) kitleri kullanılarak yapıldı.

3.8.2 PZR ile *mecA* Gen Bölgesinin Çoğaltılması

Kullanılan primerler; ***mecA*-F:** 5'-GGGATCATAGCGTCATTATTC-3'

***mecA*-R:** 5'-AACGATTGTGACACGATAGCC-3'

MecA-F 1µl, *mecA* -R 1µl, 2X toptaq master mix 12,5 µl, 10X coral load 2,5 µl, H₂O 5,5 µl toplamda her bir örnek için karışım 22,5 µl olacak şekilde amplifikasyon mixi hazırlandı ve tüplere dağıtım yapıldı. Tüplere her örnek için daha önce ekstraksiyon işlemi sonrası elde edilen DNA'lardan 2,5 µl eklendi. Daha sonra örnekler;

Tablo 3.1 MecA gen bölgesi için PZR reaksiyon şartları

Reaksiyon aşamaları	Isı (°C)	Süre(dakika)	Siklus sayısı
Denatürasyon	94 °C	3 dakika	1 siklus
Denatürasyon	94 °C	30 saniye	35 siklus
Bağlanma	55 °C	30 saniye	
Uzama	72°C	1 dakika	
Final uzama	72 °C	10 dakika	1 siklus

olacak şekilde termal döngücihazına yerleştirildi (136).

3.8.3 PZR ile *mecC* Gen Bölgesinin Çoğaltılması

Kullanılan primerler; *mecC*-F: 5'-GAA AAA AAG GCT TAG AAC GCC TC-3'

mecC-R: 5'-GAA GAT CTT TTC CGT TTT CAG C-3'

MecC-F 1µl, *mecC* -R 1µl, 1 µl, 2X toptaq master mix 12,5 µl, 10X coral load 2,5 µl, H₂O 5,5 µl toplamda her bir örnek için karışım 22,5 µl olacak şekilde amplifikasyon mixi hazırlandı ve tüplere dağıtım yapıldı ve tüplere her örnek için daha önce ekstraksiyon işlemleri yapılan DNA'dan 2,5 µl eklendi. Daha sonra örnekler;

Tablo 3.2 *MecC* gen bölgesi için PZR reaksiyon şartları

Reaksiyon aşamaları	Isı (°C)	Süre(dakika)	Siklus sayısı
Denatürasyon	94 °C	15dakika	1 siklus
Denatürasyon	94 °C	30 saniye	30 siklus
Bağlanma	59 °C	1 dakika	
Uzama	72 °C	1 dakika	
Final uzama	72 °C	10 dakika	1 siklus

olacak şekilde termal döngücihazına yerleştirildi (137).

3.8.4 Elde Edilen PZR Ürünlerinin Jel Elektroforezi ve Görüntülenmesi

MecA ve *mecC* gen bölgelerini göstermek için yapılan PZR sonrası elde edilen ürünler %1,5'lik agaroz jelde yürütüldü. Agaroz jel için 2.25 gram (gr) moleküler grade agaroz (Vivantis, Malezya) tartılarak 150 ml 1X TBE (Tris, Borik asit, EDTA) içerisine eklenip mikrodalga fırına yerleştirildi. Kaynatılmayan çözelti tamamen eriyip berraklaşınca kadar mikrodalga fırında ısıtıldı. Agaroz jel oda sıcaklığında bekletildi ve sıcaklığı yaklaşık 60°C'ye geldiğinde 30 µl etidyum bromid eklenip karıştırıldı ve uygun tarakların yerleştirildiği jel tabağına 3-5 mm kalınlıkta olacak şekilde döküldü. Agaroz donuncaya kadar beklendikten sonra jel tabağıyla birlikte elektroforez tankı içerisine jeldeki delikli kısımlar katoda gelecek şekilde yerleştirildi. Jel tabağın üzerindeki taraklar çıkarıldıktan sonra tankın üzerini hafif geçecek şekilde 1X TBE çözeltisi tanka aktarıldı. Elde edilen amplifikasyon ürünlerinden 10 µl alınarak tarakların çıkarılmasıyla oluşan kuyucuklara bırakıldı. Örneklerin doğru değerlendirilebilmesi için büyüklüğü bilinen bir marker da ilk ve son kuyucuklara eklendi. Üç saat 80 V elektrik akımı uygulanan örneklerin elektroforezde göçü sonrasında oluşan bantların fotoğrafları (Gel logic 2200 imaging system, 1708X1280 pixel, Kodak Company, NY, USA) çekilerek değerlendirme yapıldı.

3.9 Pulsed Field Gel Electrophoresis Yöntemi ile İzolatların Değerlendirilmesi

MecA pozitif bulunan 68 izolat arasındaki klonal ilişkinin değerlendirilmesi amacıyla Durmaz ve ark. tarafından modifiye edilen PFGE protokolü uygulandı (138). Eksi 80°C de stoklanan bakteriler çözündürülerek kanlı besiyerine tek koloni ekimleri yapıldı. Sonrasında bakteriler 1 atmosfer basınçta 37 °C de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda üreyen saf koloniler steril tek kullanımlık öze ile alınarak 1 ml hücre süspansiyon tamponu (HST) (50mM EDTA, 10mM Tris-HCL, 20nM NaCl, pH:7.2) içeren steril cam tüplerin içerisinde süspanse edildi. Hazırlanan süspansiyonların, 4 °C'de, 2500 x g'de, 15 dakika santrifüj işlemleri yapıldıktan sonra üstteki sıvı boşaltıldı ve yerine tekrar 1ml HST ilave edildikten sonra vortekslendi. Süspansiyonun optik dansitesi 590 nm'de 1 absorbans olacak şekilde hazırlandı. % 2 düşük erime ısılı agaroz uygun balon jojeye konularak üzerine 23.5 HST ilave edildi. Daha sonra ağzı kapatılarak mikrodalgaya yerleştirilen joje içindeki agaroz ısıtıldı. Agaroz tamamen eriyinceye kadar ısıtma işlemi aralıklı olarak tekrarlandı. Ependorf tüpleri 50 °C'ye ayarlanmış kuru ısı bloğuna yerleştirildi ve eriyik haldeki agarozdan

150 µl alınarak ependorf tüplere dağıtıldı. HST içinde hazırlanmış olan bakteri süspansiyonundan 150 µl alınarak 150 µl agaroz bulunan ependorf tüpüne bırakıldı. Bu karışımın üzerine 2µl lizostafin eklenerek hücrelerin homojen dağılması için pipetajı yapıldı ve 100 µl alınarak uygun agaroz kalıplarına eklendi. Her bakteri için işlem aynı şekilde tekrarlandı.

Kalıplar katılaşması için +4 °C’de buzdolabında 15 dakika tutuldu. Kalıplardan çıkarılan bakteri plugları 0.5ml hücre lizis solüsyonu (HLS) (10mM Tris-HCL, 50 mM NaCl, 50mM EDTA, %0.2 sodyum deoksikolat, %0.5 sarkozil, pH:7.2) içeren steril kapaklı tüplerin içine yerleştirildi. 37°C’de çalkalamalı su banyosunda 1 gece bekletildikten sonra, pluglara zarar vermeden HLS steril pipetlerle boşaltılarak yerine proteinaz K solüsyonu (250mM EDTA,%1 sarkozil, 50ug/ml proteinaz K, pH:9.0) eklendi. Bu solüsyonda da 50 °C’de çalkalamalı su banyosunda 1 gece bekletilen pluglar katılaşması için buz içerisinde 15 dakika bekletildi. Steril pipetlerle pluglara zarar vermeden proteinaz K solüsyonu boşaltıldı. Sonrasında kalıplar her seferde 50 °C’de 30 dakika olacak şekilde 3 kez 4 ml ultra saf su ve 3 kez de 4 ml TE tamponu (10mM Tris-HCL, 0.1 mM EDTA, pH:7.6) ile yıkandı. Bu işlemlerin sonunda kalıplar restriksiyon enzimleri ile kesim aşamasına geldi. Agaroz kalıbı steril bir bistüri yardımıyla 1/4 oranında kesildi. Kesilen parça 100 ul 1X *SmaI* tamponu bulunan ependorf tüpün içerisine bırakıldı ve 30 °C’de çalkalamalı su banyosunda yaklaşık 10 dakika bekletildikten sonra sıvı aspire edildi. Aspire edilen sıvının yerine final konsantrasyonu 2.5 ul olan *SmaI* enziminden 50 ul kondu ve yaklaşık 2 saat 30°C’ye ayrılmış çalkalamalı su banyosunda bekletildi. Sonrasında tüpler 15 dakika +4 °C’de bekletildi. 0.5X TBE (44.5 mM Borik asit, 44.5 mM Trisma base, 1 mM EDTA, pH:8.4) tamponundan 100 ml alınarak %1 olacak şekilde agaroz jel hazırlandı. RE ile kesilen kalıplar 15 dişli tarağın dişlerinin uç kısımlarına dikkatli biçimde yerleştirildi. Tarağın 1, 8 ve 15. dişlerine kontrol kalıp yüklendi. Daha sonra yatay şekilde duran kalıp dikey şekle getirilir ve hazırlanan ve 45-50 °C ısıda bekleyen agaroz jel kasetin içerisine döküldü. Soğuyan agaroz jelin içerisinde bulunan tarak dikkatlice çıkarılıp jel PFGE tankına yerleştirildi. Elektroforez koşulları aşağıdaki gibi ayarlandı;

- Initial time: 1sn
- Final time: 30sn
- Run time: 22h
- 6V/cm²

- 14°C

Elektroforez süresi tamamlandıktan sonra jel 5 ug/ml’lik etidyum bromür içerisinde 20 dk bekletildikten sonra UV ışık ile görüntüleme işlemi gerçekleştirildi. Gel logic 2200 imaging system (ayrım gücü: 1708X1280 pixel, Kodak Company, NY, USA) kullanılarak kalıpların fotoğrafları çekildi. GelComparII yazılım sistemi (version 3.0, Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. Her resimde bulunan kontrol kalıpları kullanılarak resimler arası normalizasyon yapıldı. Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA) kullanılarak dendogram oluşturulup kümeleşe analizleri yapıldı. Dice benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlendi. Bant ve profil toleransı %1-1.5 arasında tutuldu.

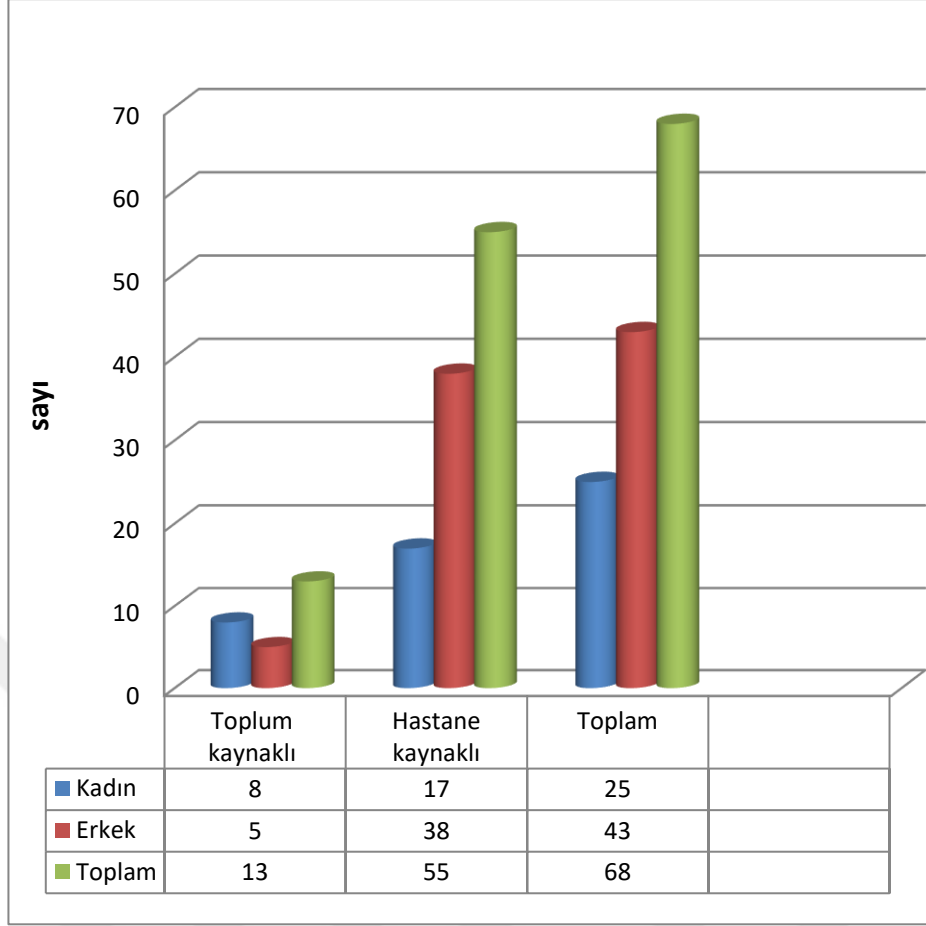
4. BULGULAR

Çalışmaya 2015-2020 yılları arasında İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarında, çeşitli örneklerden izole edilerek -80°C de stoklanmış 68 MRSA izolatı dahil edildi. Aynı hastaya ait birden fazla örnek çalışma dışı bırakıldı.

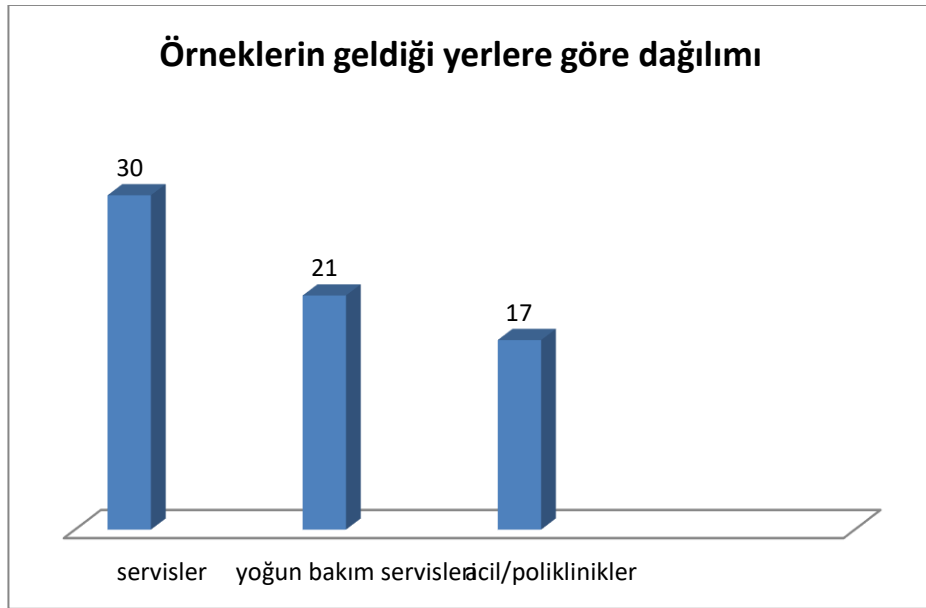
4.1 *S. aureus* İzolatlarının Elde Edildiği Örneklerin Dağılımları

Tablo 4.1 MRSA izolatlarının örneklere göre dağılımı

Kan	24
Solunum yolu	11
İdrar	1
Steril vücut sıvısı	1
Yara/Abse	30
BOS	1
Toplam	68



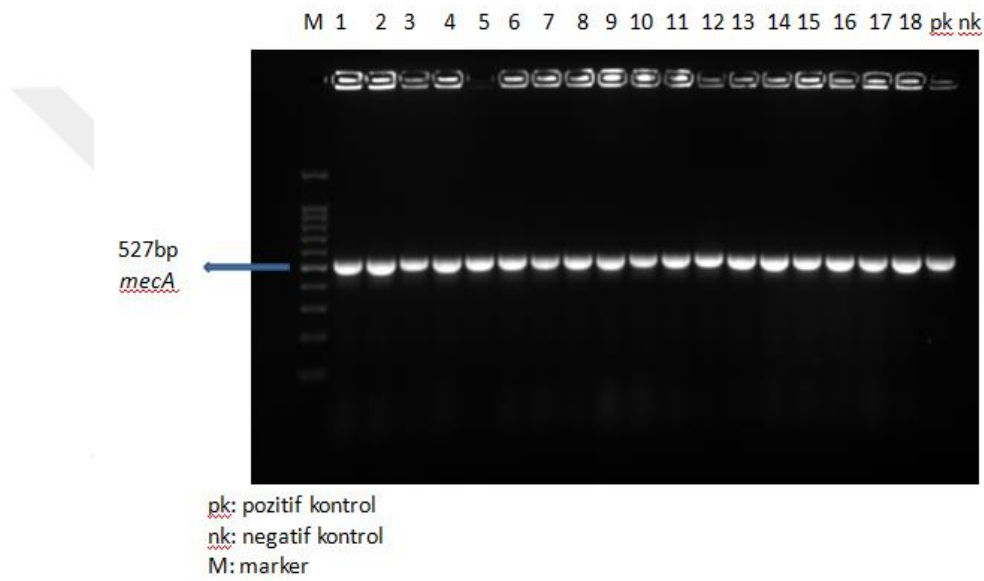
Şekil 4.1 Örneklerin kaynağı ve cinsiyete göre dağılımı



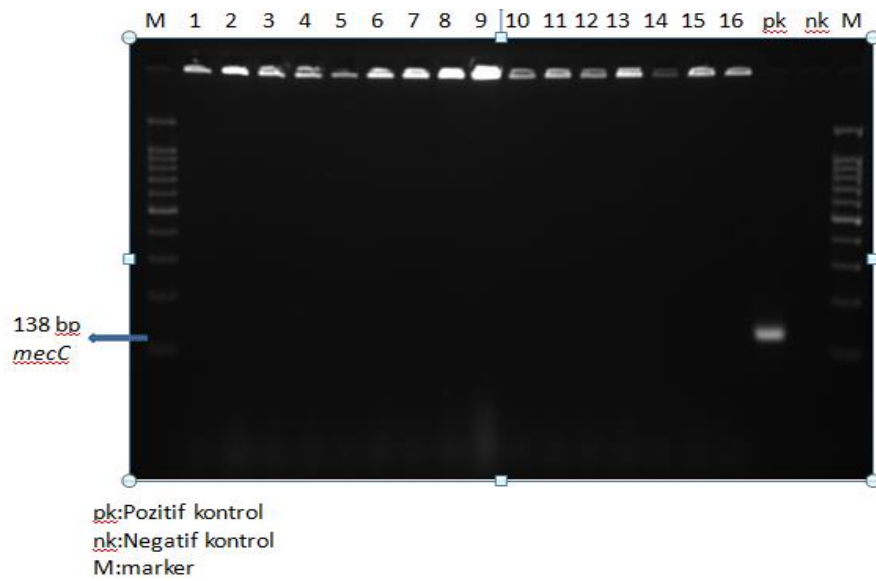
Şekil 4.2 Örneklerin geldiği bölümlere göre dağılımı

4.2 PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Çalışmamızda *mecA-F* ve *mecA-R* primerleri kullanılarak izolatlarda *mecA* gen varlığı, *mecC-F* ve *mecC-R* primerleri kullanılarak da *mecC* gen bölgesinin varlığına bakılmıştır. 527 baz çiftlik bölgede gözle görülebilen bant varlığı *mecA* geninin varlığını, 138 baz çiftlik bölgede görülen bant varlığı ise *mecC* geninin varlığını göstermektedir. Buna göre 68 izolatın tamamında *mecA* gen bölgesi varlığı gösterilmiş olup *mecC* gen bölgesini gösteren baz çifti bölgesinde herhangi bir bant oluşumu gösterilememiştir. *mecC* geni için pozitif kontrol olarak NCTC 13552 standart suşu kullanılmıştır.



Resim 4.1 *MecA* pozitif bulunan izolatlardan ilk 18 izolat



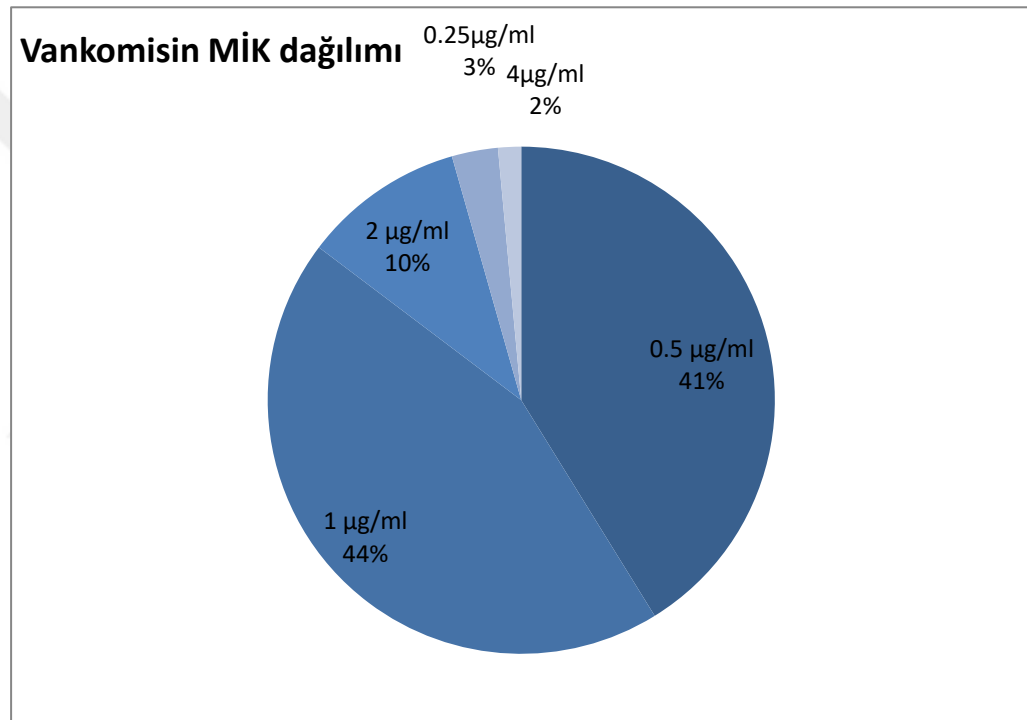
Resim 4.2 *MecC* negatif bulunan örneklerden ilk 16'sı

4.3 Makro E-Test Sonuçları

Wootton ve ark. (134) nın uyguladığı bu yöntemle göre plaklar 24 ve 48. saatlerin sonunda değerlendirmeye alındı. Bu sürelerin sonunda tüm plaklardaki üreyen bakterilerin MİK değerleri 8 µg/ml'nin altındaydı. Bu yöntemle göre VISA/hVISA açısından şüpheli hiçbir izolat tespit edilemedi.

4.4 Broth mikrodilüsyon sonuçları

68 izolatın tamamında broth mikrodilüsyon yöntemi ile vankomisin MİK değerleri belirlendi. Vankomisin MİK sonuçlarının dağılımı aşağıdaki gibidir.



Şekil 4.3 İzolatların vankomisin MİK dağılımları

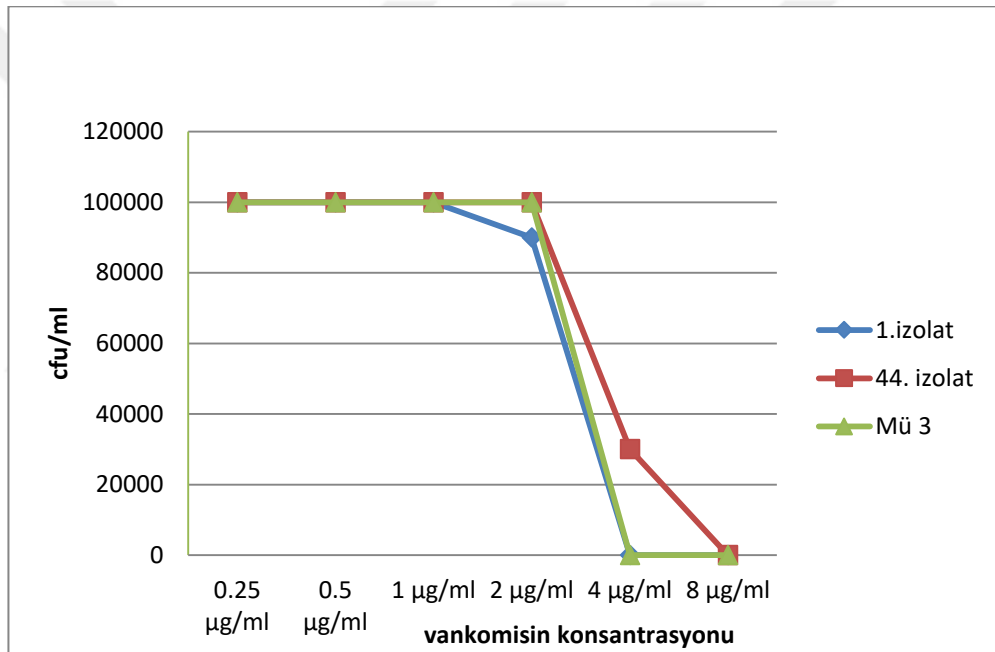
İzolatların MİK₅₀ değeri 1 µg/ml, MİK₉₀ değeri ise 2 µg/ml olarak belirlendi.

4.5 PAP Analizi Sonucu

2 µg/ml vankomisin içeren BHI agar tarama sonucuna göre 6 VISA, 4 hVISA olmak üzere toplam 10 şüpheli izolat bulundu. Şüpheli bulunan 10 izolat incelendiğinde 1 izolat haricinde hepsinin hastane kökenli olduğu sonucuna varıldı. Toplum kaynaklı olan tek izolat ise hastanın vücutta oluşan 3. derece yanık nedeniyle hastaneye yatışının yapıldığı gün gönderilen örnekten izole edilmiştir. Bu izolatların bulunduğu örneklerin

gönderildiği hastalar incelendiğinde hiçbirinin daha önce vankomisin tedavisi almadığı ve vankomisin tedavisi altında olmadığı belirlendi.

Bu izolatlara PAP-AUC yöntemi uygulandı. Eğri altında kalan alanlar, yamuk kuralı (trapezoid rule) kullanılarak hesaplandı. Buna göre 1. izolatın eğri altında kalan alanın mü3 izolatının eğri altında kalan alanına oranı 0.99 çıkmış olup bu suş hVISA olarak değerlendirilmiştir. 44. izolatın eğri altında kalan alanının mü3 suşunun eğri altında kalan alanına oranı ise 1.97 çıkmış olup bu izolat da VISA olarak değerlendirilmiştir. 1. izolat, 44. izolat ve mü3 izolatına ait grafikler aşağıdaki gibidir.

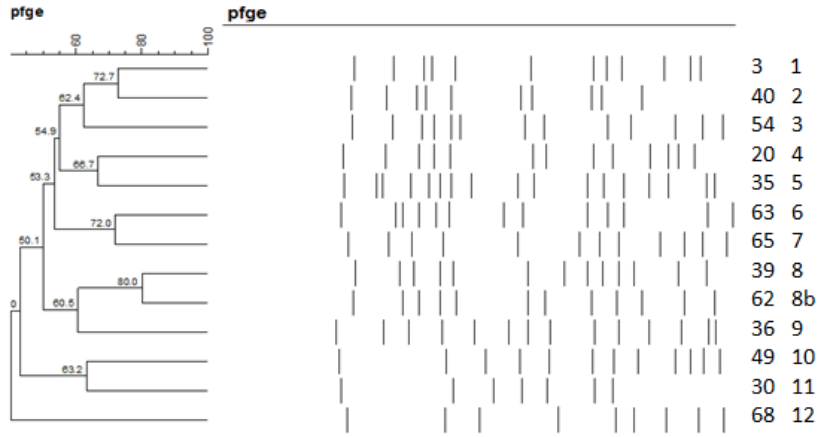


Şekil 4.4 1., 44. ve mü 3 izolatlarına ait PAP-AUC grafiği

VISA şüpheli 3 suşun broth mikrodilüsyon sonucu 0.5 µg/ml, 2 suşun 1 µg/ml, 1 suşun 4µg/ml, hVISA şüpheli 2 suşun 0.5 µg/ml, 2 suşun ise 1 µg/ml olarak bulunmuştur. PAP-AUC ile hVISA olduğu doğrulanan suşun vankomisin MİK değeri 1 bulunmuştur.

4.6 PFGE Analizi Bulguları

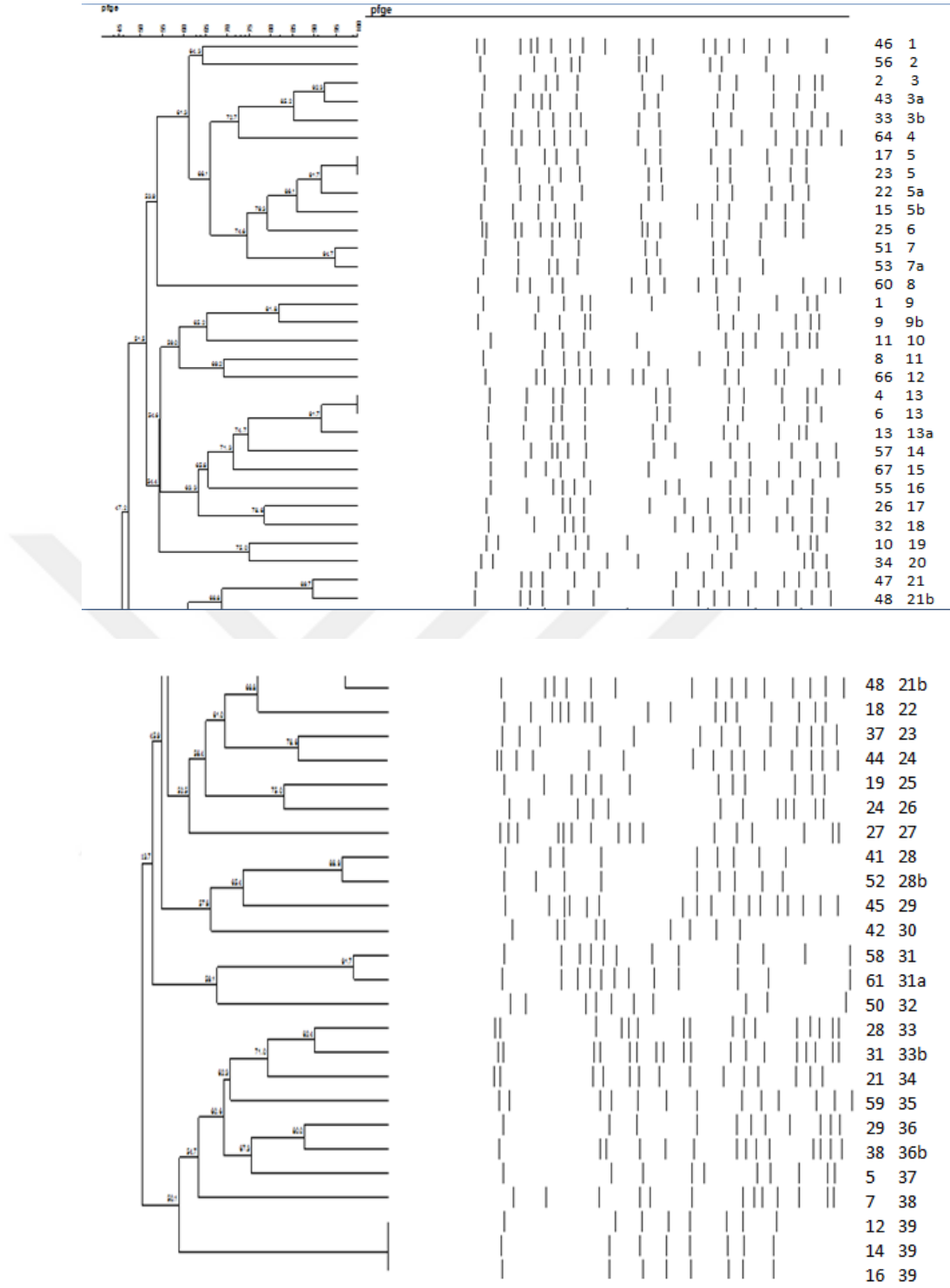
68 izolat toplum kaynaklı ve hastane kaynaklı olmalarına göre ikiye ayrılmış olup PFGE analizleri ayrı ayrı yapılmıştır. Buna göre 13 toplum kaynaklı izolatın PFGE sonucu aşağıdaki gibidir.



Resim 4.3 Toplum kaynaklı izolatlarda PFGE analizi

Toplamda 13 izolat incelenmiş olup 12 farklı genotip tespit edilmiştir baskın bir salgın suşu tespit edilememiştir.

Hastane kaynaklı izolatlardaki PFGE sonucu aşağıdaki gibidir.



Resim 4.4 Hastane kaynaklı izolatlarda PFGE analizi

Hastane kaynaklı toplam 55 izolat incelenmiş olup 39 farklı genotip tespit edilmiştir. Baskın bir salgın suşu tespit edilememiştir.

5. TARTIŞMA

S. aureus toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan en önemli patojenlerden biridir. 1880 yılında Alexander Ogston tarafından cerrahi bir yara enfeksiyonundan izole edilen *S. aureus*, sağlıklı bireylerde asemptomatik olarak bulunabilmekle birlikte osteomyelit, endokardit ve toksik şok sendromu gibi ciddi, hayatı tehdit edici enfeksiyonlara da neden olmaktadır (2, 3, 17).

Penisilinin kullanıma girmesinden önce, klinik olarak ciddi enfeksiyonlara yol açan *S. aureus*'a bağlı hastalıkların mortalite oranı yaklaşık %80 olarak bildirilmiştir (139). 1928 yılında Alexander Fleming'in penisilini keşfi ve 1940'larda klinik kullanıma girmesiyle *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisinde önemli bir gelişme kaydedilmiştir. Ancak penisilinin bu yüz güldürücü sonucu çok uzun sürmemiştir. 1942'de penisiline dirençli ilk *S. aureus* suşunun izole edilmesi ile başlayan serüven, 1950'lerde keşfedilen yarı sentetik anibiyotiklere (metisilin, nafsilin, oksasilin) karşı 1960'larda direnç gelişimiyle başka bir boyut kazanmış ve MRSA kavramı ortaya çıkmıştır (4, 5, 6). Oldukça virülen ve tedavisi zor olan MRSA izolatları zamanla birçok antibiyotik grubuna da direnç geliştirmiştir. Bu da bize gösteriyor ki, bu olağanüstü yetenekli bakteri ilerleyen zamanlarda daha birçok antibiyotiğe de direnç geliştirecektir (140).

Başlangıçta sadece hastane kaynaklı enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkarken zamanla topluma da yayılma eğilimi gösteren bu bakteri CDC tarafından halk sağlığı açısından acil mücadele edilmesi gereken önemli bir tehdit olarak kabul edilmektedir (141).

MRSA enfeksiyonları hastane kaynaklı (HK-MRSA) ve toplum kaynaklı (TK-MRSA) MRSA enfeksiyonu olarak ikiye ayrılmıştır (52). HK-MRSA enfeksiyonları risk grubunu yakın zamanda hastaneye yatan, bakım merkezlerinde uzun süre kalan, katater veya cerrahi girişim öyküsü bulunan kişiler oluşturmaktadır ve bu enfeksiyonlar genellikle daha dirençli olmaya meyillidir (142). Stafilokokların özellikle sağlık çalışanlarında deri ve nazofarenkste asemptomatik taşıyıcılığı hastane enfeksiyonlarının en önemli nedenlerinden biridir (19,20). TK-MRSA enfeksiyonları ise hastane ile ilişkisizdir ve β -laktam dışındaki antibiyotiklere direnç gelişimi daha az görülmektedir (76).

Başlangıçta HK-MRSA sadece sağlık bakımı yapılan merkezler ile ilişkilendirilmiş olup toplumda ortaya çıkmadığı düşünülüyordu. Ancak sonraları sadece sağlık bakım merkezlerinde görülmediği anlaşıldı. İlk kez 1980'lerde tanımlandıktan sonra giderek artan oranlarda toplum kaynaklı enfeksiyon etkeni olarak izole ediliyor olması ciddi bir endişe kaynağıdır (75). Duman ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada toplum kaynaklı *S. aureus* enfeksiyonlarının %12'sini MRSA, %88'ini MSSA; hastane kaynaklı enfeksiyonların ise %42'sini MRSA, %58'ini MSSA bulmuşlar (139). Çalışmamızda, 68 MRSA suşunun 13'ü (%19.1) toplum kaynaklı, 55'i (%80.8) hastane kaynaklı olarak belirlenmiştir. Bu durum bize MRSA suşlarına bağlı enfeksiyonların toplumda hiç de azımsanmayacak düzeyde bulunduğunu göstermektedir. MRSA ile olan savaşı lehimize çevirebilmek için MRSA suşlarının virülansını tanımlayan faktörleri iyi bilmek oldukça önemlidir (141).

S. aureus'ta direncin ana nedeninin, *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCCmec) üzerinde yer alan *mecA* geninden kaynaklandığı bilinmektedir (8). Ancak 2007 yılında İngiltere'de büyükbaş süt sığırları üzerine yapılan bir çalışmada sefoksitine dirençli ama *mecA* gen bölgesi içermeyen suşlara rastlanmış ve bu suşlardan izole edilen gen bölgesi *mecC* olarak adlandırılmıştır. Daha sonraki yıllarda bu genin sadece hayvan kaynaklı enfeksiyonlarda değil, insan kaynaklı enfeksiyonlardan da izole edilebildiği gösterilmiştir (10, 11, 68).

MecA ve *mecC* tarafından kodlanan PBP2a her ne kadar biyokimyasal açıdan farklılıklar gösterse de bu suşlar laboratuvar taramalarında doğru bir şekilde MRSA olarak tanımlanmaktadırlar. Yapılan çalışmalar sefoksitin disk difüzyon, sıvı mikrodilüsyon ve agar dilüsyon testlerinin oksasiline'den daha güvenilir olduğunu göstermektedir (142). Ancak yapılan bazı çalışmalarda görülen şudur ki, *mecA* MRSA'da suşlar tipik olarak sefoksitine dirençli olmakla birlikte oksasiline de dirençlidir. Aksine, *mecC* MRSA'da suşların çoğunluğu yine sefoksitine dirençlidir ancak oksasiline duyarlıdır (143). 2012 yılında Kim ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada *mecC* geninin oksasiline, *mecA* geninin sefoksitine daha seçici olduğu gösterilmiştir (71). Çetinkol ve arkadaşlarının koagülaz negatif ve pozitif toplamda 256 suş üzerine yapmış oldukları bir çalışmada oksasiline disk difüzyon testi ile metisiline dirençli 183 suş, sefoksitin disk difüzyon testi ile ise 181 suş dirençli bulunmuştur (144). Bu çalışmadan yola çıkarak *mecC* MRSA'nın laboratuvarlarda ön tespiti için

sefoksitin ve oksasiline birlikte kullanımının ön değerlendirme yapmada daha yüksek doğruluk oranı sağlayacağı kanısındayız.

Cikman ve ark. Türkiye’de yapmış olduğu bir çalışmada 2013-2016 yılları arasında 7 bölgeden gönderilen 494 MRSA izolatında *mecC* geni varlığına bakılmış ancak hiç *mecC* genine rastlanmamıştır. 315 izolatta ise *mecA* geni gösterilmiştir. 179 izolatta ise *mecA* veya *mecC* genine rastlanmamıştır (137). Almanya’da yapılan bir başka çalışmada farklı yıllarda toplanan 3207 MRSA suşunda *mecC* geni araştırılmış ancak bu çalışmada da *mecC* içeren suşa rastlanmamıştır (145). Becker ve ark. rutin MRSA taraması sırasında metisiline dirençli ancak *mecA* ve *mecC* geni içermeyen bir suşa rastlamış ve daha sonra bu suşta plazmid aracılığıyla taşınan *mecB* geni varlığını göstermiştir (146).

Yapmış olduğumuz çalışmada, metisilin direncine sefoksitin disk difüzyon yöntemi ile bakılmış olup, dirençli bulunan 68 izolatın tamamında PZR ile *mecA* gen bölgesi varlığı gösterilmiştir. Bütün suşlarda *mecA* geninin bulunması metisilin direncinin ana kahramanının *mecA* geni olduğunu doğrulamaktadır. Ancak, çalışmamızda, yukarıdaki çalışmalara benzer şekilde *mecC* gen bölgesi içeren izolata rastlamadık. *MecC* geni içeren suşların halk sağlığı açısından büyük problem oluşturabileceğine dair ciddi endişeler bulunsa da insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda *mecC* gen bölgesi varlığının çok yüksek düzeylerde olmadığı görülmektedir (137).

MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde ilk tercih olarak önerilen antibiyotik olan vankomisin, 1956 yılında *Streptomyces orientalis*’ten elde edildikten hemen sonra klinik kullanıma girmiştir. Ancak yan etkilerinin fazla olması nedeniyle daha sonraları kullanımı terk edilen bu antibiyotik MRSA enfeksiyonlarının ortaya çıkmasıyla yeniden kullanılmaya başlanmıştır (78).

Clinical and Laboratory Standards Institute rehberine göre vankomisin MİK değeri ≤ 2 µg/ml olan suşlar duyarlı, 4-8 µg/ml olanlar orta duyarlı, >16 µg/ml olanlar ise dirençli olarak değerlendirilmektedir. Heterojen VISA ise vankomisine duyarlı bir *S. aureus* popülasyonunun içinde vankomisin MİK değeri >2 µg/ml olan az sayıda (yaklaşık 10^6 da 1) alt grup bulunması olarak tanımlanmaktadır (15, 79). Vankomisine dirençli suşlar aynı zamanda teikoplanin gibi diğer glikopeptid antibiyotiklere de dirençli olduğundan, glikopeptidlere orta duyarlı *S. aureus* (GISA) veya glikopeptidlere dirençli *S. aureus* (GRSA) terimleri de kullanılmaktadır (147). EUCAST rehberine göre

ise vankomisin için belirlenen sınır değeri 2 µg/ml 'dir. Vankomisin MİK ≤2 µg/ml olan suşlar duyarlı, >2 µg/ml olan suşlar dirençli kabul edilmektedir. Bu rehber gere göre orta duyarlılık terimi bulunmamaktadır (132).

VRSA izolatlarının, enterokoklardaki *vanA* geninin Tn1546 transpozonunun entegre olduğu bir plazmid aracılığıyla *S. aureus*'a aktarılması sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir. Bu aktarım sonucu D-alanin yerine D-laktat sentezlenmekte ve vankomisin hücre duvarına bağlanamadığı için sentez inhibe olmamakta ve direnç gelişimi ortaya çıkmaktadır (86, 87). Enterokoklardan aktarılan bu genin çok hızlı yayılarak halk sağlığı açısından büyük problemler oluşacağı düşüncesi, 2002 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde ilk VRSA suşlarının bildiriminden sonra ciddi endişelere yol açmıştır (148,149). Ancak, biri Hindistan biri de İran'da olmak üzere 2 ek vakayla 9'a ulaşan VRSA sayısı bu direncin çok da hızlı yayılmadığını gözler önüne sermiştir. Bu yolla yayılım oldukça ciddi olmakla birlikte vaka sayısının az olması da iyi bir gelişme olarak değerlendirilmektedir. Ancak, günümüzde gittikçe artan oranlarda bildirilen vankomisine azalmış duyarlılık ve heterojen düşük düzeyde direnç varlığı daha fazla ilgi odağı olmayı başarmıştır (150).

VISA/hVISA oluşum mekanizması tam olarak da aydınlatılamamış olmakla birlikte VRSA oluşumundan farklıdır. Bu izolatlar *vanA* geni içermeyip vankomisine daha düşük düzeyde direnç göstermektedir. Bu konu üzerine yapılan çalışmalar, hVISA/VISA suşları ile hücre duvar kalınlaşması, otolizde azalma ve yüksek anyonik yüklerin azalmasını ilişkilendirmiştir (88). VISA suşlarında, düzensiz şekilli, kalınlaşmış hücre duvarları ile sonuçlanan ek miktarlarda sentezlenmiş peptidoglikan olduğu gösterilmiştir. Daha fazla D-Ala-D-Ala kalıntısının açığa çıkmasına yol açan peptidoglikan ipliklerinin çapraz bağlanmasında da azalma vardır. Sonuç olarak, vankomisini bağlamak ve yakalamak için daha fazla D-Ala-D-Ala artışı oluşmakta, bağlanan vankomisin daha sonra ilaç moleküllerinin sitoplazmik membrandaki hedeflerine ulaşmasında başka bir engel olarak karşımıza çıkmaktadır (89).

1997'de Japonya'da klinik bir örnekten bildirilen VISA suşu ilk olma özelliğini taşıırken günümüzde dünyanın birçok bölgesinden izole edildiğine dair raporlar hiç de azımsanmayacak düzeydedir (14, 151, 152, 153). İlk VISA izolatı raporunun yayınlanmasından kısa bir süre sonra Hiramatsu ve ark. vankomisine heterodirenç gösteren *S. aureus* izolatı bildirmişlerdir. Takip eden 5 yıl içinde, sayısız ülkede heteroresistant *S. aureus* izolatı gösterilmiştir (15).

Tedavide vankomisin kullanımı için, tedavi başarısızlığını önlemek amacıyla minimum inhibitör konsantrasyonun $\leq 1.5 \mu\text{g} / \text{ml}$ olması tavsiye edilmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda vankomisin MİK değeri $>1.5 \mu\text{g} / \text{ml}$ olan hastaların vankomisin tedavisine cevabın daha kötü olduğu görülmüştür (80). Musta ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada vankomisin MİK değeri ≤ 1 olan izolatların hiçbirisinde hVISA tespit edilememiş ancak MİK değerlerindeki artışla birlikte hVISA saptama oranlarında da artış saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda hVISA oranları %5 - %50 arasında değişkenlik göstermektedir (154). Iyer ve ark. 50 MRSA suşu üzerine yaptıkları çalışmada 1 izolatta hVISA belirlemiş (155), Liu ve ark. 1997-2001 yılları arasında çeşitli ülkelerdeki çalışmalardan yola çıkarak yaptıkları çalışmada 7920 *S.aureus* izolatında hVISA oranının %1.67 olduğunu bildirmişlerdir (156). Hiramatsu ve ark. bir üniversite hastanesinden izole edilen 129 MRSA suşunda hVISA prevalansını %9.3 olarak bulmasına karşın, devlet hastanesinden izole edilen 970 suşta bulunan oran sadece %1.3 idi. Bu da bize suşlarının izole edildiği yerlere göre hVISA bulunma sıklığının değiştiğini göstermektedir (157).

VISA ve hVISA'nın vankomisin ile tedavi esnasında tedaviye yanıtın kötüleşmesi, kalıcı bakteremi, daha uzun hastanede kalış süresi ile ilişkili olduğuna dair çalışmalar vardır (158). Bu da VISA ve hVISA önemini gözler önüne sermektedir. Günümüzde MRSA enfeksiyonu tedavisinde ilk seçilecek ilaç grubu olan glikopeptid antibiyotikler, giderek artan oranlarda hVISA suşları ile karşılaşılması nedeniyle tedavi başarısızlığı yaşamamak adına daha akılcı kullanılmalıdır (159).

Glikopeptid direncini belirlemede PAP-AUC altın standart yöntem olmasına rağmen maliyet etkinliği tartışmalıdır. Bu amaçla daha az maliyetli ve daha az zahmetli çeşitli yöntemler denenmektedir. Vankomisin E-test şeritlerinin tek başına veya teikoplaninle kullanılması bunlardan bir tanesidir. Son zamanlarda ise vankomisin E test şeritleri yerine glikopeptid direnç saptama şeritleri (glycopeptides resistance detection; GRD) kullanılmaya başlanmıştır. Uygulanması kolay olan bu yöntem ile PAP-AUC yöntemi karşılaştırılmış ancak performansının istenen düzeyde olmadığı anlaşılmıştır. Ayrıca E test şeritleri broth mikrodilüsyonla karşılaştırıldığında ise E test şeritlerinin MİK değerlerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Yanlış dirençli sonuç vermemek adına glikopeptid antibiyotiklerin MİK sonuçları broth mikrodilüsyon yapılarak belirlenmelidir (160).

Her ne kadar tarama besiyerlerinin duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olmasa da GRD testi gibi başka tarama yöntemleri de denenmektedir. MET ve agar tarama yöntemleri de bu amaca hizmet etmektedir. Ancak bu yöntemlerin duyarlılıkları çalışmadan çalışmaya fark ettiği için güvenilirlikleri hala sorgulanmaktadır. Çapın ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada MET tarama yöntemi ile %4.7 oranında şüpheli izolata rastlanmış ancak hiçbirisi PAP-AUC yöntemi ile doğrulanamamıştır (161). Chaudhari ve ark. yapmış oldukları çalışmada bu tarama besiyerlerini karşılaştırmışlardır. BKİ-V6, MET ve standart gradyent MİK > 2 µg/ml yöntemlerinin PAP-AUC yöntemine göre duyarlılıklarını sırasıyla 0,75; 0,67 ve 1; pozitif öngörü değerinin ise 0,43; 0,40 ve 0,27 olduğunu belirtmişlerdir (162). Çalışmamızda bu amaçla tüm izolatlara MET yöntemi ile de tarama yapılmış ancak hiç şüpheli izolata rastlanmamıştır.

CDC, içinde 6 µg/ml vankomisin bulunan beyin kalp infüzyon agar ile VISA/hVISA taraması yapılmasını önermektedir (163). Buna göre çalışmamızda 6 µg/ml vankomisin içeren beyin kalp infüzyon agarla standart Mü3 (*S.aureus*NCTC 700698), Mü50 (*S.aureus*NCTC 700699) ve glikopeptidlere duyarlı standart suş (*S. aureus* ATCC 29213) kullanıldı. 24 saatin sonundaki ilk değerlendirmede Mü50 suşunun ürediği, Mü3 suşu ve duyarlı standart suşun üremediği, 48 saatin sonunda yapılan değerlendirme sonucunun da aynı şekilde olduğu gözlemlendi. Buna göre besiyerindeki vankomisin miktarı azaltılarak ayrı ayrı taramalar yapıldı ve 2µg/ml vankomisin içeren beyin kalp infüzyon agar besiyerinde Mü50 suşunun 24 saatin sonunda ürediği, Mü3 ve duyarlı standart suşun üremediği, 48 saatin sonunda ise Mü3 suşunun üreyip standart duyarlı suşun üremediği gözlemlendi. Bu nedenle çalışmamızda 2 µg/ml vankomisin içeren beyin kalp infüzyon agar besiyeri tarama besiyeri olarak kullanıldı. Bu da bize çalışmanın yapılacak olduğu laboratuvarın şartları göz önünde bulundurularak uygun vankomisin agar tarama konsantrasyonunun belirlenebileceğini düşündürdü.

Çalışmamızda 10 adet VISA, hVISA şüpheli izolattan 1 tanesi PAP-AUC yöntemi ile hVISA, 1 tanesi de VISA olarak belirlenmiştir. Bu 2 suşdan hVISA olanın MİK değeri de 0.5 µg/ml, VISA olanın MİK değeri ise 4 µg/ml olarak bulundu. Bu da bize broth mikrodilüsyon yönteminin tek başına hVISA suşlarını belirlemedeki yetersizliğini gözler önüne sermektedir. Buna rağmen PAP-AUC yönteminin uygulanmasındaki zorluk, maliyet ve zaman gibi kavramlar göz önüne alındığında, bu yöntemin laboratuvarlarda rutin uygulamaya konulması da akıllarda soru işareti

birakmaktadır. Ancak çalışmamızda şaşırtıcı olan bulgu, bu suşların üretildiği hastalar hastanemizde daha önce vankomisin tedavisi almamıştı ve suşlar üretildiği zaman da vankomisin tedavisi almıyordu. Bu konu üzerine yapılan çalışmalarda belirtildiği gibi glikopeptid grubu antibiyotiklerin kullanılmasının VISA ve hVISA oluşumuna yol açmasından başka bir durumun (Örneğin, vanA geninin aktarıldığı gibi VISA ve hVISA genlerinin suşlar arasında aktarımının olmuş olabileceği) buna neden olmuş olabileceğini ya da daha önce başka merkezlerde vankomisin tedavisi almış olabileceğini düşündürmektedir. VISA ve hVISA oluşumunun temelinde yatan durumlar üzerine daha fazla moleküler ve genetik çalışmaların yapılması bu konuya ışık tutacaktır.

Giderek artan oranlarda VISA ve hVISA suşlarına rastlanması, bu yöntemden ziyade daha kolay ve uygulanabilir yöntemler geliştirilmesine duyulan ihtiyacı artırmaktadır. MALDI-TOF MS gibi kütle spektrometresi kullanılarak yapılan bir çalışmada, VISA, hVISA ve MSSA izolatları bu yöntemle belirlenmeye çalışılmış olup, VISA suşları %100'e yakın bir oranla, MSSA ve hVISA suşları ise sırayla %76 ve %76 gibi oranlarla doğrulukları belirlenmiştir. hVISA belirleme oranının düşük olması ise popülasyondaki hVISA oranının yaklaşık 10^5 - 10^6 'da bir olmasından kaynaklı diğer suşların pik oluşturmadaki baskınlığı bu izolatların gizlenmesine yol açması olarak düşünülmüştür. Bu sistemin avantajı ise hasta başına maliyetin oldukça düşük olması, harcanan emek ve zamanın az olmasıdır (164). Bu tip yöntemlerin geliştirilmesinin laboratuvarlara ciddi katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak hastanemizde VISA ve hVISA suşları belirlenmiştir. Bu suşların hastane ortamında artması, hatta topluma yayılarak toplum kaynaklı *S. aureus* enfeksiyonlarına neden olması önemli bir endişe kaynağı oluşturmaktadır. Ayrıca, vankomisine karşı her geçen gün artan direnç bu suşlara bağlı enfeksiyonların tedavi seçeneklerini azaltmaktadır. Bu nedenle, toplumda ve hastane ortamında bu suşların yayılımını engelleyecek önlemlerin ve uygulamaların hayata geçirilmesi çok önemlidir. Dolayısıyla MRSA'ların neden olduğu, özellikle sağlık bakım ilişkili enfeksiyonlarda bu suşların direnç oranlarının takip edilmesinin ve dirençli suşların hastanelerde kolonizasyonunun önlenmesi için gerekli enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınmasının faydalı olacağı kanısındayız.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Center for Diseases Control and Prevention (CDC) tarafından belirlenen kriterler doğrultusunda 68 MRSA suşunun 12'si (%17.6) toplum kaynaklı, 56'sı (%82.3) hastane kaynaklı olarak belirlenmiştir.

68 MRSA suşunun tamamında PZR yöntemi ile *mecA* ve *mecC* gen bölgesi varlığına araştırılmış ve suşların tamamında *mecA* gen bölgesi gösterilmiş, ancak *mecC* gen bölgesi belirlenememiştir.

VISA ve hVISA belirlemek amacıyla zaman ve maliyet gibi nedenler gözönünde bulundurularak PAP-AUC yönteminden önce MET ve agar tarama yöntemleriyle tüm suşların taraması gerçekleştirilmiştir.

MET tarama yöntemine göre şüpheli hiçbir izolata rastlanmamıştır

CDC önerileri doğrultusunda agar tarama yöntemi standart Mü3 (*S. aureus* NCTC 700698), Mü50 (*S. aureus* NCTC 700699) ve glikopeptidlere duyarlı standart suş (*S. aureus* ATCC 29213) kontrol suşları kullanılarak 6 µg/ml vankomisin içeren beyin kalp infüzyonagarla yapılmış ancak 24. saatin sonundaki ilk değerlendirmede Mü50 suşunun ürediği, Mü3 suşu ve duyarlı standart suşun ümediği, 48. saatin sonunda yapılan değerlendirme sonucunun da aynı şekilde olduğu gözlemlendi. Buna göre besiyerindeki vankomisin miktarı azaltılarak ayrı ayrı taramalar yapıldı ve 2 µg/ml içeren beyin kalp infüzyon besiyerinde Mü50 suşunun 24. saatin sonunda ürediği, Mü3 ve duyarlı standart suşun ümediği, 48. saatin sonunda ise Mü3 suşunun üreyip standart duyarlı suşun ümediği gözlemlendi. Bu nedenle çalışmamızda 2 µg/ml içeren beyin kalp infüzyon içeren besiyeri tarama besiyeri olarak kullanıldı. Bu da bize çalışmanın yapılacak olduğu laboratuvarın şartları göz önünde bulundurularak uygun vankomisin agar tarama konsantrasyonunun belirlenebileceğini düşündürdü.

Agar tarama yöntemi ile 6 VISA, 4 hVISA olmak üzere şüpheli 10 suş belirlendi. Bu suşlara doğrulama amacıyla PAP-AUC yapıldı ve 1 suş VISA, 1 suş da hVISA olarak değerlendirildi.

Clinical and Laboratory Standards Institute rehberine göre MİK değeri 4 µg/ml orta duyarlı kategorisinde bulunan suşun PAP-AUC yöntemi ile de VISA olduğu doğrulanmıştır. Diğer suşların tamamı MİK ≤ 2 µg/ml duyarlı olarak tespit edilmiş olup 1 tanesinin PAP-AUC yöntemi ile hVISA olduğu doğrulanmıştır.

Tüm suşlara PFGE uygulanmış olup salgın suşu tespit edilememiştir.

Giderek artan oranlarda VISA ve hVISA suşlarına rastlanması, bu yöntemden ziyade daha kolay ve uygulanabilir yöntemler geliştirilmesine duyulan ihtiyacı artırmaktadır.

MALDI-TOF MS gibi kütle spektrometresi kullanılarak yapılan bir çalışmada, VISA, hVISA ve MSSA izolatları bu yöntemle belirlenmeye çalışılmış olup, VISA suşları %100'e yakın bir oranla, MSSA ve hVISA suşları ise sırayla %76 ve %76 gibi oranlarla doğrulukları belirlenmiştir. Bu sistemin avantajı ise hasta başına maliyetin oldukça düşük olması, harcanan efor ve zamanın az olmasıdır. Bu tip yöntemlerin geliştirilmesinin laboratuvarlara ciddi katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Her ne kadar PAP-AUC yöntemi zaman, maliyet ve deneyimli personel gerekliliği gibi dezavantajlara sahip olmasına karşın altın standart yöntem olması itibarıyla epidemiyolojik araştırmalarda kullanılmaya devam edilmektedir.

Sonuç olarak hastanemizde VISA ve hVISA suşları belirlenmiştir. Glikopeptid grubu antibiyotiklerle tedavi sırasında başarısızlığa neden olan bu suşların artması ciddi bir endişe kaynağıdır.

Bu nedenle toplumda ve hastane ortamında bu suşların yayılımını önleyecek tedbirlerin ve uygulamaların hayata geçirilmesi için gerekli enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınmasının faydalı olacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Gould D, Chamberlaine A. *Staphylococcus aureus*: a review of the literature. Journal of Clinical Nursing. 1995;4(1):5-12
2. M. Hallin, A. Deplano, O. Denis, R. De Mendonca, R. De Ryck, and M. J. Struelens. Validation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis and spa Typing for Long-Term, Nationwide Epidemiological Surveillance Studies of *Staphylococcus aureus* Infections,. Journal of Clinical Microbiology. 2007;45(1):127-33
3. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, Beach M, Group SP. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. Clinical Infectious Disease. 2001;32(2):114-32
4. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nature Reviews Microbiology. 2009;7(9):629–41
5. Rammelkamp CH, Maxon T. 1942. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 1942;51(3):386–389.
6. 16. Wolk DM, Struelens MJ, Pancholi P, Davis T, Della-Latta P, Fuller D, Picton E, Dickenson R, Denis O, Johnson D, Chapin K. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in wound specimens and blood cultures: multicenter preclinical evaluation of the Cepheid Xpert MRSA/SA skin and soft tissue and blood culture assays. J Clin Microbiol. 2009;47(3):823–826.
7. Antonanzas F, Lozano C, Torres C. Economic features of antibiotic resistance: the case of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Pharmacoeconomics. 2015; 33(4):285-325.
8. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC) Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): Guidelines for reporting novel SCCmec elements. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(12):4961–7.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing-Nineteenth Informational Supplement.

- CLSI/NCCLS Document M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania 2009.
10. García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, Walpole E, Brooks K, Pickard DJ, Teale C, Parkhill J, Bentley SD, Edwards GF, Girvan EK, Kearns AM, Pichon B, Hill RL, Larsen AR, Skov RL, Peacock SJ, Maskell DJ, Holmes MA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis*. 2011; 11(8):595-603
 11. Ito T, Hiramatsu K, Tomasz A, de Lencastre H, Perreten V, Holden MT, Coleman DC, Goering R, Giffard PM, Skov RL, Zhang K, Westh H, O'Brien F, Tenover FC, Oliveira DC, Boyle-Vavra S, Laurent F, Kearns AM, Kreiswirth B, Ko KS, Grundmann H, Sollid JE, John JF Jr, Daum R, Soderquist B, Buist G, International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Guidelines for reporting novel mecA gene homologues. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(10):4997-9
 12. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, Shah S, Rudrik JT, Pupp GR, Brown WJ, Cardo D, Fridkin SK. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. *New England Journal of Medicine*. 2003; 348(14):1342-7.
 13. <https://www.tmc-online.org/userfiles/file/EUCAST-ceviri-2017.pdf> Son erişim tarihi: 03.02.2021.
 14. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* . 1997; 40(1): 135–46.
 15. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, Fukuchi Y, Kobayashi I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet*. 1997; 350(9092):1670-3.
 16. Charles PG, Ward PB, Johnson PD, Howden BP, Grayson ML. Clinical features associated with bacteremia due to heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*. 2004; 38(3):448-51.
 17. Ogston A. Report upon Micro-Organisms in Surgical Diseases. *British Medical Journal*. 1881;12; 1(1054):369.b2-375.
 18. Ogston A. Micrococcus Poisoning. *J Anat Physiol*. 1882; 16(Pt 4):526-67.

19. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 6th Philadelphia: Mosby 2009; 209-223.
20. Winn, WC ve Koneman, EW (2017). Koneman'ın renk atlası ve teşhis mikrobiyolojisi ders kitabı . Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
21. Goodyear CS, Silverman GJ. B cell superantigens: a microbe's answer to innatelike B cells and natural antibodies. Springer Semin Immunopathology. 2005;26(4):463-484.
22. Valeva A, Hellmann N, Walev I, Strand D, Plate M, Boukhallouk F, Brack A, Hanada K, Decker H, Bhakdi S. Evidence that clustered phosphocholine head groups serve as sites for binding and assembly of oligomeric protein pore. The Journal Biological Chemistry. 2006;281(16):26014-26021
23. Usbey M, Shi K, Brown CK, Digre J, Mengistu F, Seo KS, Bohach GA, Schlievert PM, Ohlendorf DH, Earhart CA. Structure and biological activities of β -toxin from *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology. 2007;189(23):8719-8726.
24. Ira J, Johnston LJ. sphingomyelinase generation of ceramide promotes clustering of nanoscale domains in supported bilayer membranes. Biochimica et Biophysica Acta. 2008;1778(1):185-197
25. Verdon J, Girardin N, Lacombe C, Berjeaud JM, Héchard Y. Delta-hemolysin, an update on membrane-interacting peptide. Peptides 2009;30(4):817-823
26. Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Önemli ve Sorunlu Gram-Pozitif Bakteri Enfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara 2004;9-22 .
27. Cunningham A, Brick T, Cooper M, Danin J, Hunt D, Jeanes A, Kearns AM, Nolan M, Lyall H. Severe invasive Panton-Valentine leucocidin positive *Staphylococcus aureus* infections in children in London, UK. The Journal of Infection. 2009;59(1):28-36
28. Sharma-Kuinkel BK, Ahn SH, Rude TH, Zhang Y, Tong SYC, Ruffin F, Genter FC, Braughton KR, Deleo FR, Barriere SL, Fowler Jr VG . Presence of genes encoding Panton-Valentine leukocidin is not the primary determinant of outcome in patients with hospital-acquired pneumonia due to *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology. 2012;50(3):848-856
29. Ladhani S. Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 2003;39(2):181-189

30. Ladhani S, Joannou CL. Difficulties in diagnosis and management of the staphylococcal scalded skin syndrome. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2000;19(9):819-822
31. Hart ME, Hart MJ, Roop AJ. Genotypic and phenotypic assesment of hyaluronidase among type strains of a select group of staphylococcal species. *International Journal of Microbiology*. 2009;2009:614371
32. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation*. 2003;111(9):1265-73
33. Von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *The New England Journal of Medicine*. 2001;344(1):11-16
34. Chang FY, MacDonald BB, Peacock JE Jr, Musher DM, Triplett P, Mylotte JM, O'Donnell A, Wagener MM, Yu VL. A prospective multicenter study of *Staphylococcus aureus* bacteremia: incidence of endocarditis, risk factors for mortality, and clinical impact of methicilin-resistance. *Medicine (Baltimore)*. 2003;82(5):322-332
35. Cosgrove SE, Fowler VG Jr. Management of methiclin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clinical Infectious Disease* 2008;46(5):386-393.
36. Bennett MI, Tai YM, Symonds JM. Staphylococcal meningitis following synchroed intrathecal pump implant: a case report. *Pain*. 1994;56(2):243-244
37. American Thoracic Society., Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *American Journal of Respiratory and Clinical Care Medicine*. 2005;171(4):388-416.
38. DeRyke CA, Lodise TP Jr, Rybak MJ, McKinnon PS. Epidemiology, treatment, and outcomes of nosocomial bacteremic *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Chest*. 2005;128(3):1414-22.
39. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, et al. Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton–Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet*. 2002;359(9308):753–9.
40. Adem PV, Montgomery CP, Husain AN, Koogler TK, Arangelovich V, Humilier M, Boyle-Vavra S, Daum RS. *Staphylococcus aureus* sepsis and the Waterhouse-

- Friderichsen syndrome in children. *The New England Journal of Medicine*. 2005;353(12):1245-51.
41. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG Jr. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015;28(3):603-661.
 42. Espersen F, Frimodt-Moller N, Skinhoj P, Bentzon MW. Changing pattern of bone and joint infections due to *Staphylococcus aureus*: study of cases of bacteremia in Denmark, 1959-1988. *Reviews of Infectious Disease*. 1991;13(3):945-948
 43. Amreeta Dhanoa, Vivek Ajit Singh, Azura Mansor, Mohd Yasim Yusof, King-Ting Lim & Kwai-Lin Thong. Acute haematogenous community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in an adult: Case report and review of literature. *BMC Infectious Diseases*. 2012; 25;12:270
 44. Gemmell CG. Staphylococcal scalded skin syndrome. *Journal of Medical Microbiology*. 1995;43(5):318-27
 45. Moss C, Gupta E. The Nikolsky sign in staphylococcal scalded skin syndrome. *Archives of Disease in Childhood*. 1998;79(3):290.
 46. Oliveira AR, Aires S, Faria C, Santos E. Staphylococcal scalded skin syndrome. *BMJ Case Reports*. 2013;2013:bcr2013009478.
 47. Descloux E, Perpoint T, Ferry T, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Mohammadi I, Etienne J. One in five mortality in non-menstrual toxic shock syndrome versus no mortality in menstrual cases in a balanced French series of 55 cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008;27(1):37-43.
 48. Rupp ME, Ulphani JS, Fey PD, Bartscht K, Mack D. Characterization of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in mouse foreign body model. *Infection and Immunity*. 1999;67(5):2627-2632
 49. Descloux E, Perpoint T, Ferry T, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Mohammadi I, Etienne J. One in five mortality in non-menstrual toxic shock syndrome versus no mortality in menstrual cases in a balanced French series of 55 cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008;27(1):37-43
 50. Lin YJ, Cheng MC, Lo MH, Chien S. Early Differentiation of Kawasaki Disease Shock Syndrome and Toxic Shock Syndrome in a Pediatric Intensive Care Unit. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2015; 34(11):1163-7.

51. Stolz SJ, Davis JB, Vergeront JM, Crass BA, Chesney PJ, Wand PJ, Bergdoll MS. Development of serum antibody to toxic shock toxin among individuals with toxic shock syndrome in Wisconsin. *The Journal of Infectious Disease*. 1985;151(5):883-889
52. Ünal S. MRSA Problemi. *ANKEM Derg* 2009;23(Ek 2):1-12.
53. Ippolito G, Leone S, Lauria FN, Nicastri E, Wenzel RP. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the superbug. *Int J Infect Dis* 2010; 14(4): 7-11.
54. Soriano A, Marco F, Martínez JA, Pisos E, Almela M, Dimova VP, Alamo D, Ortega M, Lopez J, Mensa J. Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis* 2008; 46(2): 193-200.
55. Skinner D, Keefer CS. Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*. *Arch. Intern. Med.* 1941;68(5):851–875
56. Basetti M, Trecarichi EM, Mesini A, Spanu T, Giacobbe DR, Rossi M, Shenone E, Pascale GD, Molinari MP, Cauda R, Viscoli C, Tumbarello M. Risk factors and mortality of healthcare-associated and community-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(9):862-869
57. Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*?. *Emerging Infectious Disease*. 2001;7(2):178-82.
58. Lederberg J. Mechanism of action of penicillin. *Journal of Bacteriology*. 1957;73(1):144
59. Bondi A Jr, Dietz CC. Penicillin resistant staphylococci. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1945;60(1):55-58
60. Gregory PD, Lewis RA, Curnock SP, Dyke KG. Studies of the repressor (BlaI) of beta-lactamase synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*. 1997;24(5):1025-37
61. Zhang HZ, Hackbarth CJ, Chansky KM, Chambers HF. A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to beta-lactams in staphylococci. *Science*. 2001;291(5510):1962-5
62. Bagcigil AF, Taponen S, Koort J, Bengtsson B, Myllyniemi AL, Pyörälä S. Genetic basis of penicillin resistance of *S. aureus* isolated in bovine mastitis. *Acta Vet Scand.* 2012;54(1): 69
63. Johnson AP, Livermore DM: Quinupritin/dalfopristin: a new addition to antimicrobial arsenal. *Lancet*. 1999;354(9195):2012-3.

64. Griffiths C, Lamagni TL, Crowcroft NS, Duckworth G, Rooney C. Trends in MRSA in England and Wales: analysis of morbidity and mortality data for 1993-2002. *Health Statistics Quarterly*. 2004;(21):15-22
65. Johnson AP, Livermore DM: Quinupritin/dalfopristin: a new addition to antimicrobial arsenal. *Lancet*. 1999;354(9195):2012-2013.
66. Sjöström JE, Löfdahl S, Philipson LJ .Transformation reveals a chromosomal locus of the gene(s) for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 1975;123(3):905-915.
67. Wu SW, de Lencastre H, Tomasz AJ. Recruitment of the *mecA* gene homologue of *Staphylococcus sciuri* into a resistance determinant and expression of the resistant phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*. 2001;183(8):2417-24
68. Loncaric I, Kübber-Heiss A, Posautz A, Stalder GL, Hoffmann D, Rosengarten R, Walzer C. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus spp.* carrying the *mecC* gene, isolated from wildlife. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013;68(10):2222-2225.
69. Harrison EM, Paterson GK, Holden MT, Morgan FJ, Larsen AR, Petersen A, Leroy S, De Vlieghe S, Perreten V, Fox LK, Lam TJ, Sampimon OC, Zadoks RN, Peacock SJ, Parkhill J, Holmes MA. A *Staphylococcus xylosus* isolate with a new *mecC* allotype. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013;57(3):1524-8.
70. Małyszko I, Schwarz S, Hauschild T. Detection of a new *mecC* allotype, *mecC2*, in methicillin-resistant *Staphylococcus saprophyticus*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014;69(7):2003-2005
71. Kim C, Milheirico C, Gardete S, Holmes MA, Holden MT, de Lencastre H, Tomasz A. 2012. Properties of a novel PBP2A protein homolog from *Staphylococcus aureus* strain LGA251 and its contribution to the beta-lactam-resistant phenotype. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(44):36854-63.
72. Becker K, Larsen AR, Skov RL, Paterson GK, Holmes MA, Sabat AJ, Friedrich AW, Köck R, Peters G, Kriegeskorte A. Evaluation of a modular multiplex-PCR methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* detection assay adapted for *mecC* detection. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(6):1917-9
73. CDC –Issues in healthcare settings-Antimicrobial resistance-CA-MRSA Information for clinicians.

74. Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C, Jamklang M, Chongtrakool P, Boyle-Vavra S, Daum RS, Hiramatsu K Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(4):1147-52.
75. Elston DM. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Am Acad Dermatol. 2007;56(1):1-16;17-20.
76. Chambers HF, Deleo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol. 2009;7(9):629-41
77. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev. 1997;10(4):781-91.
78. Gültekin M, Günseren F. Vankomisin dirençli enterokoklar. Hastane Enfeksiyonları Derg. 2000;4:195-204.
79. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 28th informational supplement CLSI document M100-S28; 2018, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
80. Song KH, Kim M, Kim CJ, Cho JE, Choi YJ, Park JS, Ahn S, Jang HC, Park KH, Jung SI, Yoon N, Kim DM, Hwang JH, Lee CS, Lee JH, Kwak YG, Kim ES, Park SY, Park Y, Lee KS, Lee YS, Kim HB. Impact of Vancomycin MIC on Treatment Outcomes in Invasive *Staphylococcus aureus* Infections. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(3): e01845-16.
81. Kirst HA, Thompson DG, Nicas TI. Historical yearly usage of vancomycin. Antimicrob Agents Chemother. 1998;42(5):1303-4.
82. Schwalbe RS, Stapleton JT, Gilligan PH. Emergence of vancomycin resistance in coagulase-negative staphylococci. The New England Journal of Medicine. 1987;316(15):927-31.
83. Fridkin SK, Hageman J, McDougal LK, Mohammed J, Jarvis WR, Perl TM, Tenover FC, Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Epidemiology Study Group. Epidemiological and microbiological characterization of infections caused by *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin, United States, 1997-2001. Clin Infect Dis. 2003;36(4):429-39.
84. Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance

- mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. Clin Microbiol Rev. 2010;23(1):99-139
85. Van Hal SJ, Jones M, Gosbell IB, Paterson DL. Vancomycin heteroresistance is associated with reduced mortality in ST239 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* blood stream infections. PLoS One. 2011; 6(6):e21217.
 86. Appelbaum PC: MRSA-the tip of the iceberg, Clin Microbiol Infect 2006;12(Supp 2):3-10.
 87. Stryjewski ME, Corey GR. New treatments for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Curr Opin Crit Care. 2009;15(5):403-12.
 88. Xu J, Pang L, Ma XX, Hu J, Tian Y, Yang YL, Sun DD. Phenotypic and Molecular Characterisation of *Staphylococcus Aureus* with Reduced Vancomycin Susceptibility Derivated in Vitro. Open Med (Wars). 2018;13:475-486.
 89. Hanaki H, Labischinski H, Inaba Y, Kondo N, Murakami H, Hiramatsu K .Increase in glutamine-non-amidated muropeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu50. J Antimicrob Chemother. 1998;42(3):315-20.
 90. Walsh TR, Howe RA. The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. Annu Rev Microbiol. 2002; 56:657-75
 91. Deresinski S. The multiple paths to heteroresistance and intermediate resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis. 2013 Jul; 208(1):7-9
 92. Hooper DC. Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. Lancet Infect Dis. 2002 Sep; 2(9):530-8
 93. Høiby N, Jarløv JO, Kemp M, Tvede M, Bangsbo JM, Kjerulf A, Pers C, Hansen H. Excretion of ciprofloxacin in sweat and multiresistant *Staphylococcus epidermidis*. Lancet. 1997 ; 349(9046):167-9.
 94. Ng EY, Trucksis M, Hooper DC. Quinolone resistance mediated by norA: physiologic characterization and relationship to flqB, a quinolone resistance locus on the *Staphylococcus aureus* chromosome. Antimicrob Agents Chemother. 1994; 38(6):1345-55.
 95. Ince D, Zhang X, Hooper DC. Activity of and resistance to moxifloxacin in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(4):1410-5.
 96. Entenza JM, Que YA, Vouillamoz J, Glauser MP, Moreillon P. Efficacies of moxifloxacin, ciprofloxacin, and vancomycin against experimental endocarditis

- due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing various degrees of ciprofloxacin resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(11):3076-83.
97. Torres-Viera C, Dembry LM : Approaches to vancomycin-resistant enterococci, *Curr Opin.Infect Dis* 2004;17(6):541-7.
 98. Ginsburg I: The role of bacteriolysis in the pathophysiology of inflammation, infection and postinfectious sequelae, *APMIS* 2002;110(11):753-70.
 99. Cafiso V, Bertuccio T, Purrello S, Campanile F, Mammina C, Sartor A, Raglio A, Stefani S *dltA* overexpression: A strain-independent keystone of daptomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents.* 2014 Jan; 43(1):26-31
 100. Cui L, Isii T, Fukuda M, Ochiai T, Neoh HM, Camargo IL, Watanabe Y, Shoji M, Hishinuma T, Hiramatsu K. An *RpoB* mutation confers dual heteroresistance to daptomycin and vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Dec; 54(12):5222-33.
 101. Argudín MA, Roisin S, Dodémont M, Nonhoff C, Deplano A, Denis O. Mutations at the Ribosomal S10 Gene in Clinical Strains of *Staphylococcus aureus* with Reduced Susceptibility to Tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018 ; 62(1):
 102. Stryjewski ME, Corey GR. New treatments for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Crit Care* 2009; 15(5): 403-12.
 103. Lentino JR, Narita M, Yu VL. New antimicrobial agents as therapy for resistant gram-positive cocci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27(1): 3-15
 104. Nannini E, Murray BE, Arias CA. Resistance or decreased susceptibility to glycopeptides, daptomycin, and linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Pharmacol* 2010; 10(5): 516-21.
 105. Gold HS, Pillai SK. Antistaphylococcal agents. *Infect Dis Clin North Am* 2009; 23(1): 99-131.
 106. Adaleti R, Nakipoglu Y, Ceran N, Tasdemir C, Kaya F, Tasdemir S. Prevalence of phenotypic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates to macrolide, lincosamide, streptogramin B, ketolid and linezolid antibiotics in Turkey. *Braz J Infect Dis* 2010; 14(1): 11-4.
 107. Küçükbayrak A, Özdemir D. iki yeni protein sentez inhibitörü: Linezolit ve Streptograminler. *İnfeks Derg.* 2006; 20:145-51

108. Gould IM. Clinical activity of anti-Gram-positive agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother 2011; 66(Suppl 4): iv17-21.
109. Mendes RE, Deshpande LM, Farrell DJ, Spanu T, Fadda G, Jones RN. Assessment of linezolid resistance mechanisms among *Staphylococcus epidermidis* causing bacteraemia in Rome, Italy. J Antimicrob Chemother 2010; 65(11): 2329-35
110. Sánchez García M, De la Torre MA, Morales G, et al. Clinical outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. JAMA 2010; 303(22): 2260-4
111. Bryson HM, Spencer CM: Quinupristindalfopristin: antibacterial activity, pharmacokinetic profile, therapeutic trials and tolerability and current status, Drugs 1996;52(3):406-15.
112. CDC: National Nosocomial Infections Surveillance(NNIS) system report, data summary from January 1990-May 1999. Am J Infect Control 1999;27(6):520-32.
113. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39(3):577-85
114. Lall LCM, Sahni BAK. Prevalence of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples. Medical Journal Armed Forces India. 2014;70(1): 43-47
115. Fiebelkorn KR, Crawford SA, McElmeel ML, Jorgensen JH Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol. 2003; 41(10):4740-4.
116. Eisenstein BI. Treatment of staphylococcal infections with cyclic lipopeptides. Clin Microbiol Infect 2008; 14: 10-6
117. Dogruman-Al F, Akça G, Aykan B, Sipahi AB, Çağlar K. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarında kinupristin/dalfopristin, linezolid duyarlılıkları ve makrolit-linkozamit-streptogramin B direnci. İnfeksiyon Derg 2008; 22(3): 153-63.
118. Bush K, Heep M, Macielag MJ, Noel GJ. Anti-MRSA beta-lactams in development, with a focus on ceftobiprole: the first anti-MRSA beta-lactam to demonstrate clinical efficacy. Expert Opin Investig Drugs 2007; 16:419-29

119. Chambers HF. Ceftobiprole: in vivo profile of a bactericidal cephalosporins. Clin Microbiol Infect 2006; 12:17-22.
120. Anderson S D, Gums J.G. Ceftobiprole: an extended-spectrum anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cephalosporin. Ann Pharmacother 2008; 42:806-16.
121. Zhong NS, Sun T, Zhuo C, D'Souza G, Lee SH, Lan NH, Chiang CH, Wilson D, Sun F, Iaconis J, Melnick D. Ceftaroline fosamil versus ceftriaxone for the treatment of Asian patients with community-acquired pneumonia: a randomised, controlled, double-blind, phase 3, non-inferiority with nested superiority trial. Lancet Infect Dis. 2015; 15(2):161-71.
122. Kelley WL, Jousset A, Barras C, Lelong E, Renzoni A . Missense mutations in PBP2A Affecting ceftaroline susceptibility detected in epidemic hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonotypes ST228 and ST247 in Western Switzerland archived since 1998. Antimicrob Agents Chemother. 2015 ; 59(4):1922-30.
123. Long SW, Olsen RJ, Mehta SC, Palzkill T, Cernoch PL, Perez KK, Musick WL, Rosato AE, Musser JM. PBP2a mutations causing high-level Ceftaroline resistance in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58(11):6668-74
124. Harrison EM, Ba X, Blane B, Ellington MJ, Loeffler A, Hill RL, Holmes MA, Peacock SJ .PBP2a substitutions linked to ceftaroline resistance in MRSA isolates from the UK. J Antimicrob Chemother. 2016 Jan; 71(1):268-9.
125. Alm RA, McLaughlin RE, Kos VN, Sader HS, Iaconis JP, Lahiri SD. Analysis of *Staphylococcus aureus* clinical isolates with reduced susceptibility to ceftaroline: an epidemiological and structural perspective. J Antimicrob Chemother. 2014 Aug; 69(8):2065-75
126. Otero LH, Rojas-Altuve A, Llarrull LI, Carrasco-López C, Kumarasiri M, Lastochkin E, Fishovitz J, Dawley M, Hesek D, Lee M, Johnson JW, Fisher JF, Chang M, Mobashery S, Hermoso JA. How allosteric control of *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 2a enables methicillin resistance and physiological function. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Oct 15; 110(42):16808-13.
127. Fishovitz J, Rojas-Altuve A, Otero LH, Dawley M, Carrasco-López C, Chang M, Hermoso JA, Mobashery S. Disruption of allosteric response as an unprecedented

- mechanism of resistance to antibiotics. J Am Chem Soc. 2014 Jul 16; 136(28):9814-7.
128. Banerjee R, Gretes M, Basuino L, Strynadka N, Chambers HF. In vitro selection and characterization of ceftobiprole-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2008 Jun; 52(6):2089-96.
129. Strommenger B, Layer F, Klare I, Werner G. Pre-Use Susceptibility to Ceftaroline in Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates from Germany: Is There a Non-Susceptible Pool to be Selected? PLoS One. 2015; 10(5):e0125864.
130. Schaumburg F, Peters G, Alabi A, Becker K, Idelevich EA. Missense mutations of PBP2a are associated with reduced susceptibility to ceftaroline and ceftobiprole in African MRSA. J Antimicrob Chemother. 2016 Jan; 71(1):41-4.
131. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, Kaplan SL, Karchmer AW, Levine DP, Murray BE, J Rybak M, Talan DA, Chambers HF; Infectious Diseases Society of America. Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. Clinical Infectious Diseases. 2011;52(3):e18-e55.
132. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0, 2021. <http://www.eucast.org> Erişim tarihi: 11/02/2021.
133. Kuşçu F, Öztürk D, Gürbüz Y, Tütüncü E, Şencan İ, et al. Metisiline dirençli stafilokoklarda azalmış vankomisin duyarlılığının araştırılması. Mikrobiyol Bul. 2011;45(2):248-257.
134. Wootton M, MacGowan AP, Walsh TR, Howe RA. A multicenter study evaluating the current strategies for isolating *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to glycopeptides. Journal of Clinical Microbiology. 2007;45(2):329-32.
135. Wootton M, Howe RA, Hillman R, Walsh TR, Bennett PM, MacGowan AP. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2001;47(4):399-403.
136. Tunç E. Metisiline dirençli stafilokoklarda vankomisine karşı azalmış duyarlılığın araştırılması. Uzmanlık tezi. İnönü üniversitesi 2014.
137. Cıkman A, Aydın M, Gulhan B, Karakeçili F, Kurtoglu MG, Yuksekkaya S, Parlak M, Gultepe BS, Cicek AC, Bilman FB, Ciftci İH, Kara M, Atmaca S,

- Ozekinci T. Absence of the *mecC* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from various clinical samples: The first multi-centered study in Turkey. J Infect Public Health. 2019;12(4):528-533
138. Durmaz R, Köksal F, Hoşoğlu S ve ark. Hastane İnfeksiyonu Etkeni Olan *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Acinetobacter baumannii* İzolatlarının Moleküler Tiplendirmesinde Kullanılacak “Pulsed Field Gel Electrophoresis “(PFGE) Yöntemlerinin Standardizasyonu ve Kit Formatı Haline Getirilmesi. Proje No: 106S211 (SBAG–3459). 2009.
139. Duman Y, Tekerekoğlu M S, Otlu B. Toplum ve hastane kökenli *Staphylococcus aureus* klinik izolatlarında Panton-Valentine lökositin varlığının ve klonal ilişkinin araştırılması. Mikrobiyoloji Bülteni. 2013; 47(3): 389 - 400.
140. Garner MJ, Carson C, Lingohr EJ, Fazil A, Edge VL, Trumble Waddell J. An assessment of antimicrobial resistant disease threats in Canada. PLoS One. 2015; 10(4):e0125155.
141. Sahreena Lakhundi and Kunyan Zhang. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. Clin Microbiol Rev. 2018 Oct; 31(4): e00020-18
142. R, Larsen AR, Kearns A, Holmes M, Teale C, Edwards G, Hill R. Phenotypic detection of *mecC*-MRSA:cefoxitin is more reliable than oxacillin. J. Antimicrob. Chemother. 2014;69(1):133-5
143. Cartwright EJP, Paterson GK, Raven KE, Harrison EM, Gouliouris T, Kearns, Bruno Pichon A, Edwards G, Skov RL, Larsen AR, Holmes MA, Parkhill J, Peacock SJ, Török ME. Use of Vitek 2 antimicrobial susceptibility profile to identify *mecC* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. 2013;51(8):2732-4
144. Çetinkol Y , Altındış M, Çetinkaya Z, Aktepe O.C. stafilokoklarda metisilin direncinin farklı yöntemlerle araştırılması ve çoklu antibiyotik direncinin saptanması. mikrobiyol bül 2008; 42:119-124
145. Schaumburg F., Köck R., Mellmann A., Richter L., Hasenberg F., Kriesgeskorte A., , Friedrich AW, Gatermann S, Peters G, Eiff CV, Becker K, study group et. al.: Population Dynamics among Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates in Germany during a 6-Year Period . J Clin Microbiol 2012; 50: 3186-3192.

146. Becker K., van Alen S., Idelevich E.A., Schleimer N., Seggewiß J., Mellmann A., Kaspar U, Peters G. Plasmid-Encoded Transferable *mecB*-Mediated Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 2018;24(2):242–248
147. Tenover FC, Biddle JW, Lancaster MV. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 2001;7:327-332
148. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med*.1988 ;21;319(3):157-61
149. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2002;51(26):565-7.
150. Foucault ML, Courvalin P, and Grillot-Courvalin C. Fitness Cost of VanA-Type Vancomycin Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(6): 2354–2359
151. Ploy MC, Grélaud C, Martin C, de Lumley L, Denis F. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. *Lancet*. 1998; 351(9110):1212
152. Oliveira GA, Dell'Aquila AM, Masiero RL, Levy CE, Gomes MS, Cui L, Hiramatsu K, Mamizuka EM .Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2001; 22(7):443-8
153. Bierbaum G, Fuchs K, Lenz W, Szekat C, Sahl HG. Presence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Germany. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1999; 18(10):691-6
154. Musta A.C., Riedere K., Shemes S. Vancomycin MIC plus heteroresistance and outcome of methicillin –resistant *Staphylococcus aureus bacteremia*: trends over 11 years. *J Clin Microbiol*. 2009;47:1640–1644.
155. Iyer R.N., Hittinahalli V. Modified PAP method to detect heteroresistance to vancomycin among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a tertiary care hospital. *Indian J Med Microbiol*. 2008;26:176–179
156. Liu C., Chambers H.F. *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:3040–3045

157. Hiramatsu K. The emergence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Japan. *Am J Med.* 1998;104:7S–10S
158. Van Hal SJ and Paterson DL. Systematic Review and Meta-Analysis of the Significance of Heterogeneous Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(1): 405–410
159. Chen YS. Guidelines for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2013;46(3):147-50
160. Richter SS, Satola SW, Crispell EK, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* isolates with heterogeneous intermediate-level resistance to vancomycin in the United States. *J Clin Microbiol* 2011;49:4203-4207
161. Dr. Çapın BBÖ. Dolaşım sistemi enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) izolatlarında makro e-test yöntemi ile vankomisine azalmış duyarlı *S. aureus* (VISA) ve vankomisine heterojen dirençli *S. aureus* (hVISA) sıklığının ve bu suşların moleküler genetik özelliklerinin araştırılması. Tıpta uzmanlık tezi. Ankara üniversitesi Tıp fakültesi. 2016
162. Chaudhari CN, Tandel K, Grover N, Sen S, Bhatt P, Sahni AK, Praharaj AK. Heterogeneous vancomycin-intermediate among methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Medical Journal Armed Forces India.* 2015;71(1):15-8.
163. Aktaş E. Klinik Örneklerden İzole Edilen MRSA Suşlarında Vankomisine Karşı Azalmış Duyarlılığın Araştırılması. *Mikrobiyol Bül* 2010; 44: 339-341.
164. Cheryl A. Mather, Brian J. Werth, Shobini Sivagnanam, Dhruba J. SenGupta, and Susan M. Butler-Wu Rapid Detection of Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2016 Apr; 54(4): 883–890.

EKLER

EK.1. ETİK KURUL KARARI

T.C. İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA VE YAYIN ETİĞİ KURULU (Sağlık Bilimleri Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu)			
Oturum Tarihi	Oturum Sayısı	Karar Sayısı	
03.03.2020	05	2020/512	
Karar No: 2020/512: Sağlık Bilimleri Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 03.03.2020 tarihinde İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Toplantı Salonunda toplandı. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nı da Doç. Dr. Yücel DUMAN'ın sorumlu araştırmacı olduğu; Arş. Gör. Şerife UÇAR'ın yardımcı araştırmacı olduğu; "Metisiline dirençli Staphylococcus aureus izolatlarında vankomisine düşük düzeyde direnç varlığının araştırılması" başlıklı çalışması; üniversitemiz Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi açısından uygun olup-olmadığı hususundaki başvurusuna ilişkin raportör raporu görüşüldü. Çalışma Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi açısından değerlendirildiğinde; <u>çalışmanın etik açıdan uygun olduğuna;</u> oy birliği ile karar verilmiştir.			
Prof. Dr. Osman CELBİŞ Etik Kurul Başkanı			
Prof. Dr. Kadir ERTEM Etik Kurul Başkan Yrd.	KATILDI	Prof. Dr. Yüksel SEÇKİN Etik Kurul Üyesi	KATILDI
Prof. Dr. Cemşit KARAKURT Etik Kurul Başkanı	KATILDI	Prof. Dr. Barış OTLU Etik Kurul Üyesi	KATILDI
Prof. Dr. Sermin TİMUR TAŞHAN Etik Kurul Üyesi	KATILDI	Prof. Dr. Dinçer ÖZGÖR Etik Kurul Üyesi	KATILDI